

Best Available Copy

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 5 C12N 21/02, 15/19, C07K 13/00, C12N 5/10		A1	(11) 国際公開番号 WO 94/21809
			(43) 国際公開日 1994年9月29日(29.09.94)
(21) 国際出願番号 PCT/JP94/00397 (22) 国際出願日 1994年3月11日(11. 03. 94) (30) 優先権データ 特願平5/54349 1993年3月15日(15. 03. 93) JP		(81) 指定国 AU, CA, CN, FI, JP, KR, NO, NZ, US, 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(71) 出願人(米国を除くすべての指定国について) 株式会社 サイトシグナル研究所 (INSTITUTE OF CYTOSIGNAL RESEARCH, INC.) (JP/JP) 〒104 東京都中央区銀座2丁目7番地12号 Tokyo, (JP)		添付公開書類 国際調査報告書	
(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人(米国についてのみ) 川村和男(KAWAMURA, Kazuo) (JP/JP) 〒371 群馬県前橋市塙社町1-2-2 株式会社サイトシグナル研究所内 Gunma, (JP) 渡邊一義(WATANABE, Kazuyoshi) (JP/JP) 〒140 東京都品川区広町1-2-5 株式会社サイトシグナル研究所内 Tokyo, (JP)			
(74) 代理人 幸利士 平木祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.) 〒105 東京都港区虎ノ門二丁目7番7号 虎ノ門中田ビル2F Tokyo, (JP)			
(54) Title : MONOCYTE OR MACROPHAGE MIGRATION FACTOR			
(54) 発明の名称 单球又はマクロファージ遊走因子			
(57) Abstract <p>The invention relates to a protein having a monocyte or macrophage migration activity, a gene containing a DNA coding for the protein, a recombinant expression vector containing the gene, a transformant prepared by using the recombinant vector, a process for producing the protein by culturing the transformant and separating a protein having a monocyte or macrophage migration activity from the product of culture, and an immunopotentiator or wound remedy containing the protein as the active ingredient.</p>			

(57) 要約

本発明は、単球又はマクロファージ遊走活性を有する蛋白質、該蛋白質をコードするDNAを含む遺伝子、該遺伝子を含む発現用組換えベクター、該発現用組換えベクターにより形質転換された形質転換体、及び該形質転換体を培養し、得られた培養物から単球又はマクロファージ遊走活性を有する蛋白質を分離することを特徴とする前記蛋白質の製造方法並びに前記蛋白質を有効成分として含む免疫賦活剤又は創傷治療剤に関する。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AM アルメニア	CZ ナエコ共和国	KP 朝鮮民主主義人民共和国	NZ ニュー・ジーランド
AT オーストリア	DE ドイツ	KR 大韓民国	PL ポーランド
AU オーストラリア	DK デンマーク	KZ カザフスタン	PT ポルトガル
BB バルバドス	EE エストニア	LI リヒテンシュタイン	RO ルーマニア
BE ベルギー	ES スペイン	LK スリランカ	RU ロシア連邦
BF ブルキナ・ファソ	FI フィンランド	LT リトアニア	SD スーダン
BG ブルガリア	FR フランス	LU ルクセンブルグ	SE スウェーデン
BH ベナン	GA ガボン	LV ラトヴィア	SI スロヴェニア
BR ブラジル	GB イギリス	MC モナコ	SK スロヴァキア共和国
BY ベラルーシ	GE グルジア	MD モルドバ	SN セネガル
CA カナダ	GN ギニア	MG マダガスカル	TD ナイード
CF 中央アフリカ共和国	GR ギリシャ	ML マリ	TG トーゴ
CG コンゴ	HU ハンガリー	MN モンゴル	TJ タジキスタン
CH スイス	IE アイルランド	MR モーリタニア	TT トリニティ・トバゴ
CL コート・ジボアール	IT イタリー	MW マラウイ	UA ウクライナ
CM カメルーン	JP 日本	NE ニジェール	US 米国
CN 中国	KE ケニア	NL オランダ	UZ ウズベキスタン共和国
CS チェコスロ伐キア	KG キルギスタン	NO ノルウェー	VN ヴィエトナム

明 細 書

単球又はマクロファージ遊走因子

技術分野

本発明は、新規な単球又はマクロファージ遊走因子及びその製法並びに免疫賦活剤若しくは創傷治療剤に関する。

背景技術

細菌による感染症に対し、生体は単球又はマクロファージあるいは好中球などの食細胞を感染局所に浸潤集積させ、侵入した細菌を殺菌及び食食することにより生体防御を行う。更に、単球又はマクロファージは細菌の構成物質を分解し、Tリンパ球に抗原として提示し、Bリンパ球が抗原特異的な抗体産生を行うのを促すのみならず、自らも種々のサイトカイン類を産生することにより炎症や免疫反応を増幅させる。このように単球又はマクロファージは、細菌感染に対する生体防御において中心的な役割を演ずる細胞である。

この単球又はマクロファージを感染局所に呼び寄せる物質であるところの遊走因子として、Macrophage Chemoattractant Protein-1 (M C P - 1 : F E B S 1 et al., 244, 487-493, 1989) 、 R A N T E S / S I S (Nature, 347, 669-671, 1990) などの分子がこれまでに明らかにされているが、これらの遊走因子以外にも単球又はマクロファージの遊走活性を有する因子の存在が示されている。

一方、生体は本来、創傷や熱傷に対して自然治癒力を備えているが、重度の熱傷、反復して発生する床ズレ、他の疾病の合併症として発生する潰瘍、化学療法の副作用としての粘膜障害等については、生体の自然治癒力では回復しきれないものが多く、創傷、熱傷、潰瘍等の治療剤を用いる必要がある。

特に、創傷の中でも、床ズレは寝たきりの老人等に起こりやすいため、高齢化を迎えるこれから社会にとって大きな問題となりつつある。また、潰瘍の中でも、糖尿病の合併症として発症しやすい下肢の潰瘍は、糖尿病の患者数が増加しつつある現在、有効な治療剤に欠ける点で大きな問題となっている。更に、癌の化学療法や放射線療法の副作用として発症する粘膜障害も、患者のクオリティーオブ ライフ (Q O L) を低下させる点で大きな問題となっている。

従って、上記各種創傷・熱傷・潰瘍に対して早期回復を図る治療剤の開発が望まれている。

また、上記の他、角膜損傷や白内障手術後の創傷に対しても生体の自然治癒力では回復しきれず、治療剤の開発が待たれている。

現在までに開発された創傷治療剤としては、トコフェロール誘導体（特公昭49-25632号公報）が挙げられ、また、今までの創傷治療剤として開発中の高分子としては、上皮成長因子（Epidermal Growth Factor:EGF; Carpenter, G. and Cohen, S., Annu. Rev. Biochem., 48, 193-216, 1979）、纖維芽細胞増殖因子（Fibroblast Growth Factor:FGF;Gospodarowiczら、Mol. Cell. Endocrinol., 46, 187-204, 1986)、血小板由来増殖因子（Platelet Derived Growth Factor:PDGF;Betsholtzら、Nature, 320, 695-699, 1986)等があるが、現在前臨床試験段階であり、有効な創傷治療剤の開発が待たれている。

また、インスリン様増殖因子（Insulin-like growth factor;IGF)-I及びIIの物質も知られており（Froesch, E. R. ら；Ann. Rev. Physiol. 47, 443-467, 1985)、有効な創傷治療剤としての開発が期待される。

発明の開示

本発明は、従来にない新規な単球又はマクロファージの遊走活性を有する因子及びその製法を提供することを目的とする。

また、本発明は、細菌による感染症等に有用な免疫賦活剤を提供し、更に、まだ有効な医薬品が開発されていない創傷治療市場に新たな創傷治療剤を提供することを目的とする。

そこで、本発明者らは単球又はマクロファージ遊走因子について鋭意研究を行い、各種培養細胞の培養上清をスクリーニングした結果、大腸菌の内毒素であるリポ多糖（LPS）で処理したHT-1376細胞を1日から3日間培養した培養液から、これまでに報告の無い全く新しい単球又はマクロファージの遊走活性を有する蛋白質を検出・精製し、自動エドマン分解により蛋白質のアミノ末端アミノ酸配列および、蛋白分解酵素によって分解することにより得られる部分ペプチドのアミノ酸配列を決定した。アミノ酸配列の情報をもとに、この蛋白質をコ

ードするcDNAをクローニングし、その全構造を決定した。クローニングしたcDNAを解析した結果、このcDNAがコードすると考えられる蛋白質は、求める遊走因子蛋白質をそのN末端部分に含む前駆体蛋白質の構造を持つことが予想された。クローニングしたcDNA全体を発現ベクターにつなぎCos1細胞で発現させ、培養上清中に分泌された遊走活性を有するN末端部分の蛋白質を精製する方法を開発した。更に、HT-1376細胞あるいはCos1細胞培養上清中に分泌され遊走活性を示すと考えられた、前駆体N末端部分の蛋白質をコードするcDNAのみを、発現ベクターにつないで大腸菌内で大量に発現させ精製する方法も開発し、本遊走因子HT-LCF (HT-1376 cell derived Leukocyte Chemotactic Factor) の製造法を確立した。得られた遺伝子組換え型HT-LCFを用いて各種検査法により生物活性を検討した結果、遺伝子組換え型HT-LCFは好中球には作用せず、単球又はマクロファージに対して特異的に作用する遊走因子であることが明らかとなった。また、遺伝子組換え型HT-LCFは創傷並びに熱傷に対する治療効果があることが確認され、本発明を完成させた。

すなわち、本発明は以下の発明を包含する。

- (1) : 配列番号No. 1で表されるアミノ酸配列を実質的に含み、単球又はマクロファージ遊走活性を有する蛋白質、(2) : 配列番号No. 2で表されるアミノ酸配列を実質的に含み、単球又はマクロファージ遊走活性を有する蛋白質、(3) : 配列番号No. 1で表されるアミノ酸配列を実質的にコードするDNAを含む遺伝子、(4) : 配列番号No. 2で表されるアミノ酸配列を実質的にコードするDNAを含む遺伝子、(5) : 配列番号No. 3で表されるアミノ酸配列を実質的にコードするDNAを含む遺伝子、(6) : 前記(3)～(5)いずれかに記載の遺伝子を含む発現用組換えベクター、(7) : 前記(6)記載の発現用組換えベクターにより形質転換された形質転換体、(8) : 前記(7)記載の形質転換体を培養し、得られた培養物から前記(1)記載の蛋白質を分離することを特徴とする前記(1)記載の蛋白質の製造方法、(9) : 前記(7)記載の形質転換体を培養し、得られた培養物から前記(2)記載の蛋白質を分離することを特徴とする前記(2)記載の蛋白質の製造方法、(10) : 前記(1)記載の蛋白質を有効成分として含む免疫賦活剤、(11) : 前記(2)記載の蛋白質を有効成分と

して含む免疫賦活剤、(12)：前記(2)記載の蛋白質を有効成分として含む創傷治療剤、(13)：有効成分である単球又はマクロファージ遊走活性を有する蛋白質及び医薬的に許容できる賦形剤を含む医薬組成物、(14)：創傷の治療に用いる前記(13)記載の医薬組成物、(15)：免疫賦活に用いる前記(13)記載の医薬組成物、(16)：有効量の単球又はマクロファージ遊走活性を有する蛋白質をヒトに投与することを特徴とする創傷の治療方法、(17)：有効量の単球又はマクロファージ遊走活性を有する蛋白質をヒトに投与することを特徴とする免疫賦活方法、(18)：創傷の治療のため、有効量の単球又はマクロファージ遊走活性を有する蛋白質のヒトへの使用、(19)：免疫賦活のため、有効量の単球又はマクロファージ遊走活性を有する蛋白質のヒトへの使用。

ここで、本発明において「創傷」とは、広く物理的、生物・化学的なメカニズムによる組織損傷の総称をいい、体表面部、体内部のいずれに起こっているかを問わない。

物理的メカニズムには、打撲、切開、ひっかき、破断、外科的手術等外力がかかるもの、その他、熱、放射線、電気等の外部エネルギーがかかるもの等があり、物理的メカニズムによる創傷の具体例としては切り傷、打撲傷、やけど、床ズレ、放射線療法の副作用として発症する粘膜障害、角膜損傷、白内障手術後の傷等が挙げられる。

生物・化学的メカニズムには酸、アルカリ、有機化合物、生体内恒常性の擾乱、治癒力の低下、ストレス、免疫機能の昂進等があり、生物・化学的メカニズムによる創傷の具体例としてはただれ、潰瘍、他の疾病との合併症として発生する潰瘍、脱水化等が挙げられる。より具体的には、消化器潰瘍、糖尿病性の皮膚潰瘍、化学療法の副作用として発症する粘膜障害等が挙げられる。

また、アミノ酸配列を「実質的に含む」あるいは「実質的にコードする」とは、このペプチドが単球又はマクロファージ遊走活性を有する限りアミノ酸のいくつかについて欠失、置換、付加等があっても良いことを示すものである。

更に、「培養物」とは、培養液、培養菌体・細胞もしくはその破碎物、あるいは培養上清液のいずれをも意味するものである。

以下、本発明について詳細に説明する。

単球又はマクロファージの遊走活性は、ポリカーボネート製又はセルロース製のマイクロポアメンブレンフィルターなどで仕切られたケモタキシスチャンバーの上室にヒト、ラットなど必要に応じた各種動物種由来の単球又はマクロファージの懸濁液を入れ、下室には遊走因子を含むサンプル溶液を入れて試験した場合に、上室の単球又はマクロファージがどの程度下室に引き寄せられるかを計測することで測定できる (J. Exp. Med., 115, 453-466, 1962)。

上記の測定方法を用いて各種培養細胞や初代細胞の培養上清、又はヒト尿、血清、血漿中の遊走活性の有無・強弱を測定することにより、単球又はマクロファージの遊走因子を産生する培養細胞、組織を選択することができ、また、遊走因子精製のための天然の供給源を特定することができる。

ここで用いられる培養細胞はヒト由来の細胞に限定されない。また、株化された細胞に限らず、初代培養の細胞も含まれる。

細胞の培養上清サンプルの調製は、1~10%のウシ胎児血清又は0.1~0.5%ウシ血清アルブミンを含む培地等で行われる。更にLPS、ホルボルエステル等による刺激下においての調製も行われる。

このようにして得られた遊走因子を含有する培養物を材料にして、蛋白質の分離、精製に通常用いられる方法により、遊走因子を得ることができる。例えば、塩析法、遠心分離法、各種クロマトグラフィー、電気泳動等を適当に組み合わせて精製が行われる。各種クロマトグラフィーとしては、疎水、ゲルろ過、イオン交換、逆相、およびアフィニティーコロマトグラフィーなどが用いられる。また、精製品の純度並びにおよその分子量の確認は SDS (ラウリル硫酸ナトリウム) ポリアクリルアミドゲル電気泳動法、質量分析機などを用いて行われる。

なお、精製された蛋白質のアミノ酸配列の解析は、気相プロテインシークエンサーを用いた自動エドマン分解法によって行われる。アミノ酸配列の解析は通常精製した蛋白質のN末端側から順次行われるが、トリプシンなどの蛋白質分解酵素でサンプルを消化した後、精製したペプチド断片についてそのN末端側から順次行うこともできる。

解析されたアミノ酸配列をもとに、その配列をコードすると考えられるDNAの塩基配列を予測することができる。その予測に基づき、cDNAライブラリー

から目的のcDNAクローンをスクリーニングするための縮重オリゴヌクレオチドプローブあるいはPCR（ポリメラーゼ・チェイン・リアクション）に用いる縮重オリゴヌクレオチドプライマーをDNA合成機（Vu, H. and Hirschbein, B. L. らの方法；*Tetrahedron Lett.*, 32, 3005-3008, 1991）で合成することができる。

cDNAをクローニングするためにcDNAライプラリーの作製が行われる。cDNAライプラリーは、遊走因子を産生している細胞から精製したmRNAをもとに合成したcDNAを、微生物由来のレブリコンを持つ適当なベクターにつないだ後、適合する宿主に導入することで作製される。精製したmRNAからcDNAを合成する方法としては、オリゴdTをプライマーとする場合や、ランダムプライマーを用いる場合、特定塩基配列を持つ合成プライマーを使用する場合などが通常用いられる。ライプラリー作製に用いられるベクターとしてはプラスミドベクター、ファージベクター、コスミドベクター、ファージミドベクター、YACベクター等が主に使われる。宿主として、大腸菌、酵母、枯草菌等が主に使用される（*Molecular Cloning; Sambrookら、Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989*）。

ライプラリーを作製する際のcDNAとしては合成したものをそのまま使用する場合もあるが、mRNAの大きさが予めわかっている場合には、それに対応する大きさのmRNAを密度勾配遠心法によって分画するか、cDNAを電気泳動的に分画する事で、求めるクローンの含有頻度を高める事ができる。

作製したcDNAライプラリーから、求める遊走因子cDNAをコードするクローンを選択する方法としては、アミノ酸配列から合成した縮重プローブを³²Pや酵素等で標識した後スクリーニングする方法の他に、縮重プライマーを使用して行ったPCRによって得られたDNA断片をプローブとして使用することもできる。また、活性の評価系の感度と特異性が高い場合には、動物細胞でcDNAを発現させた培養上清中の活性を指標として発現クローニングを行うこともできる。遊走因子を検出する抗体が利用できる場合には、大腸菌を宿主とした発現クローニングも可能である。

このようにしてクローニングされたcDNAの塩基配列は、放射標識あるいは

蛍光標識を用いるジデオキシ法、マキサムーギルバート法等により解析することができる。

解析したDNAの塩基配列からその配列がコードするアミノ酸配列を予測することができる。得られたcDNAクローニングが求める遊走因子をコードする物であるかの確認は、精製した蛋白質のアミノ酸配列が、クローニングにコードされているかどうかで判断できる。

尚、本発明のDNAは、その一部又は全部をVu, H. and Hirschbein, B. L. の方法 [Tetrahedron Lett. 32(26), 3005-3008(1991)] による化学合成によっても得ることができる。

求めるクローニングが得られた場合には、そのcDNAを発現ベクターにつなぎ直し、発現させることによって活性の確認を行うことができる。この場合の宿主細胞としては、動物細胞や蚕細胞、酵母、大腸菌等が主に用いられる。宿主によって使用するベクターも使い分けられる。

この場合の宿主細胞としては、原核生物（例えば大腸菌）、真核生物（例えば酵母、昆虫、あるいは哺乳動物）細胞を用いることができる。哺乳動物細胞の例としては、COS細胞、チャイニーズハムスター卵巣（Chinese Hamster Ovary）細胞、C-127細胞、BHK（Baby Hamster Kidney）細胞等が挙げられる。酵母の例としては、パン酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）やメタノール資化性酵母（*Pichia pastoris*）等が挙げられる。昆虫細胞の例としては、蚕培養細胞等が挙げられる。

これらの宿主細胞を形質転換するために用いられるベクターには、大腸菌用としてpKC30（Shimatake H. and M. Rosenberg, Nature, 292, 128-132, 1981）、pTrc99A（Amann E.ら, Gene, 69, 301-315, 1988）等が挙げられる。哺乳動物細胞用としてはpSV2-neo（Southern and Berg; J. Mol. Appl. Genet., 1, 327-341, 1982）、pCAGGS（Niwaら; Gene, 108, 193-200, 1991）あるいはpCDL-SRα296（Takabeら; Mol. Cell. Biol., 8, 466-472, 1988）等が挙げられる。酵母用としては、pG-1（Schena M. and Yamamoto K. R.; Science, 241, 965-967, 1988）等が挙げられる。蚕細胞としては、組換えウイルス作製用トランスファーベクターpAc373（Luckowら; Bio/Technology, 6, 47-55, 1988）等が

挙げられる。

これらのベクターは必要に応じて複製起点、選択マーカー、プロモーターを含み、更に真核細胞用のベクターには、必要に応じてRNAスプライス部位、ポリアデニル化シグナル等が付加される。

複製起点として、哺乳動物細胞用ベクターには、SV40、アデノウイルス、ウシバビローマウイルス由来のもの等を用いることができる。大腸菌用ベクターにはColE1、R因子、F因子由来のもの等を用いることができる。酵母用ベクターには2 μ mDNA、ARS1由来のもの等を用いることができる。

遺伝子発現用プロモーターとして哺乳動物細胞用ベクターには、レトロウイルス、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、SV40由来のもの等を用いることができる。大腸菌用ベクターにはバクテリオファージ由来のものや、trp、lpp、lac、tacプロモーター等を用いることができる。パン酵母用ベクターにはADH、PHO5、GPD、PGK、MAF α プロモーター、メタノール資化性酵母についてはAOX1プロモーター等を用いることができる。蚕細胞用ベクターには核多角体病ウイルス由来のもの等を用いることができる。

選択マーカーとして、哺乳動物細胞用ベクターにはネオマイシン(neo)耐性遺伝子、チミジンキナーゼ(TK)遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)遺伝子、大腸菌キサンチングアミニホスホリボシルトランスフェラーゼ(Ecogpt)遺伝子等を用いることができる。大腸菌用ベクターにはカナマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子等を用いることができる。酵母用ベクターにはLeu2、Trp1、Ura3遺伝子等を用いることができる。

以上の様な宿主-ベクター系を適当に組み合わせて本発明の遺伝子を発現させ、遊走活性を有する蛋白質を得ることができる。

遊走活性の確認にはボイデン法(J. Exp. Med., 115, 453-466, 1962)等が使用される。

このようにして発現させた遊走因子を含む培養物より分離精製することにより、遊走因子を製造することができる。

この際には、通常の蛋白質の分離、精製に用いられる方法を組み合わせて使用

される。例えば、塩析法、遠心分離法、各種クロマトグラフィーを適当に組み合わせて行われる。各種クロマトグラフィーとしては、疎水、ゲルろ過、イオン交換、逆相、およびアフィニティーコロマトグラフィーなどが用いられる。また、精製品の純度の確認は SDS ポリアクリラミドゲル電気泳動法などにより確認できる。

なお、精製された蛋白質のアミノ酸配列の確認は、気相プロテインシークエンサーを用いた自動エドマン分解法によって行われる。

このようにして得られる遊走因子の活性成分は、そのまま本発明の免疫賦活剤若しくは創傷治療剤又はその有効成分として用いることができる。また、更に噴霧乾燥、凍結乾燥、熱風乾燥等の方法で乾燥してもよい。

上記のごとくして得られる本因子を免疫賦活剤又は創傷治療剤として投与する場合は、投与する対象を特に限定しない。例えば、個々の疾病を予防あるいは治療することを特異目的として用いることができる。また、投与する方法は経口又は非経口でもよく、経口投与には舌下投与を含む。非経口投与には、注射、例えば皮下、筋肉、静脈注射、点滴、座剤の他、クリーム剤等を含む。また、その投与量は動物か人間かによって、また、年齢、投与経路、投与回数により異なり、広範囲に変えることができる。この場合、本発明の遊走因子の有効量と適切な希釈剤及び薬理学的に使用し得る担体の組成物として投与される有効量は 1 ~ 1000 μg/kg 体重 / 日であり、1 日 1 回から数回に分けて投与される。

本発明の免疫賦活剤又は創傷治療剤を経口投与する場合、それに適用される錠剤、顆粒剤、細粒剤、散剤、カプセル剤等は、通常それらの組成物中に製剤上一般に使用される結合剤、包含剤、賦形剤、滑沢剤、崩壊剤、湿潤剤のような添加物を含有する。また、経口用液体製剤としては、内用水剤、懸濁剤、乳剤、シロップ剤等いずれの状態であってもよく、また、使用する際に再溶解させる乾燥生成物であってもよい。更に、その組成物は添加剤、保存剤のいずれを含有してもよい。

また、非経口投与の場合には、安定剤、緩衝剤、保存剤、等張化剤等の添加剤を含有し、通常単位投与量アンプル若しくは多投与量容器又はチューブの状態で提供される。上記の組成物は使用する際に適当な担体、例えば発熱物質不含の滅

菌した水で再溶解させる粉体であってもよい。

創傷治療剤の場合は、更に本発明の蛋白質に加えて、EGF、FGF、IGF-I、IGF-II、PDGF、トコフェロール誘導体等の物質の1つ以上を附加的に含有させることもできる。

図面の簡単な説明

図1は、C18逆相HPLCカラムによるHT-LCFの精製の結果を示す図である。

図2は、精製したHT-LCFのSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果を示す図である。

図3は、縮重プライマー1及び2の設計図である。

図4は、Cos1細胞由来遺伝子組換え型HT-LCFのSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果を示す図である。

図5は、V8プロテアーゼ消化後のCos1細胞由来遺伝子組換え型HT-LCFの逆相HPLCによる精製の結果を示す図である。

図6は、Cos1細胞由来遺伝子組換え型HT-LCFの質量分析装置による解析結果を示す図である。

図7は、V8プロテアーゼ消化で得られたピークAペプチドの質量分析装置による解析結果を示す図である。

図8は、Cos1細胞由来遺伝子組換え型HT-LCFの単球又はマクロファージに対する遊走活性の結果を示す図である。

図9は、Cos1細胞由来遺伝子組換え型HT-LCFの好中球に対する遊走活性の結果を示す図である。

図10は、PCRに用いたプライマーを示す図である。

図11は、大腸菌由来遺伝子組換え型HT-LCFのヒト単球に対する遊走活性の結果を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれ

らの実施例によりその技術的範囲が制限されるものではない。

〔実施例1〕 HT-LCFの単球又はマクロファージ遊走活性の測定法。
ヒト単核球は以下のようにしてヒト末梢血より調製した。血液 100mlに PBS
(リン酸緩衝生理食塩水) 100mlを混合し、Ficoll-Paque (登録商標; Pharmacia
LKB Biotechnology Inc. 製、以下「ファルマシア社製」とする) 17mlに対し
、希釈血液 33mlの割合で、両者が混じり合わないように静かに重層し、1,700r
pmで20分間、室温で遠心分離した。

浮遊している単核球層を回収し、RPMI 1640培地 (LIFE TECHNOLOGIES,
Inc. 製、以下「ギブコ社製」とする) に拡散させ、1,700rpm、室温で10分間遠
心分離処理を行った。沈殿をRPMI 1640培地に拡散させ、更に1,200rpm、
室温で3分間の遠心を行った。得られた沈殿を単球が 1mlあたり100~150万個の
濃度になるようにRPMI 1640培地に懸濁した。その細胞浮遊液50μlを48
穴マイクロケモタキシスチャンバー (ニューロプローブ社製) の上室に入れ、下
室にはHT-LCFを含むと考えられる検体を25μl入れた。フィルターはポリ
カーボネート製で5 μmの小孔を持つものを用いた。この装置をCO₂インキュ
ベーター内にて、37°Cで3時間インキュベーションした。インキュベーション後
上室の液を除き、フィルターの上室側をスクレイパーでこすり上室側に付着して
いる細胞を除いた。フィルターを風乾後にディフクイック染色液 (ミドリ十字社
製) を用いて染色し、強拡大対物レンズ (×40) を用いて無作為に選択した5視
野の全細胞数を数えた。また、下室側にこぼれ落ちた細胞も数えた。

〔実施例2〕 HT-1376細胞の培養液からのHT-LCFの精製
天然型HT-LCFは、ヒト膀胱移行上皮癌由来の細胞株HT-1376細胞
(ATCC CRL-1472) の培養液より精製した。この細胞の細胞学的性
状は Rasheedらによって報告されている (J. Natl. Cancer Inst., 58, 881-890, 197
7)。

HT-1376細胞の培養は、通常の動物細胞を培養する培地中で行った。す
なわち、DMEM培地 (ダルベッコ変形イーグル最小必須培地; ギブコ社製) を

用い、通常の培養にはこの培地に 5 %ウシ胎児血清（ギブコ社製）を含有させたものを使用した。培養は、CO₂インキュベーターを用い、5 %のCO₂濃度及び37°Cの温度の条件で行った。

HT-1376細胞よりHT-LCFを產生させるために次の通り行った。

ウシ胎児血清 5 %を含むDMEM培地を用いてHT-1376細胞を 3×10^5 個/mlの濃度で、直径10cmのシャーレに14mlずつまき、5 %CO₂濃度で37°C 3日間培養した。次に培地をLPS (10 μg/ml : SIGMA Chemical Company製、以下「シグマ社製」とする; No. L-3254) およびウシ胎児血清 (1 %) を含む培地に代えて更に2日間、同じ条件で培養した。

このようにして得られた培養液30リットルに対し80%飽和硫酸アンモニウムによる塩析を行った。沈殿した蛋白質を蒸留水に溶解させ、蒸留水に対して透析 (4°C, 2日間) を行った後、更にNaClを0.05M含む0.05Mトリス-HCl(pH7.0) 緩衝液に対して透析 (4°C, 30時間) した。同じ緩衝液で平衡化したCM-Sephadex (登録商標) C-25カラム (2.5×20cm; ファルマシア社製) に透析した試料110mlを通し、洗浄後塩濃度を0.8Mの濃度まで直線的に上昇させることにより蛋白質を溶出させた。遊走因子の活性が含まれる画分を集め、アミコンダイアフロー メンブレン (YM-5) を用いて限外ろ過を行い、2mlまで9倍に濃縮した。

次にSephadex (登録商標) G-75 (ファルマシア社製) を充填したカラムを用いたゲルろ過を行った。緩衝液としてはPBSを用いた。分子量6,000~20,000の蛋白質が溶出する位置に回収される活性画分を集め、蒸留水に対して透析 (4°C, 30時間) した。凍結乾燥させたのち、試料をTSK ODS 120T C18逆相HPLCカラム (トーソー社製; 4.6×200mm) を用いて最終精製を行った。溶離液Aとして0.05%トリフルオロ酢酸 (TFA) 溶液、溶離液Bとして0.05%TFAを含有する80%アセトニトリル溶液を用い、60分間に0%から50%までアセトニトリル濃度を直線的に増加させ蛋白質を溶出させた。溶出液は220nmの波長を用いてモニターした。流速は0.8ml/分で行った。溶出する蛋白質をピークごとに分画し、得られた分画を実施例1の方法に基づき測定した結果、単核球の遊走を誘導する活性を示す近接する4つのピーク (A, B, C, D) を得た (図1)

)。

[実施例 3] HT-1376細胞の培養液から精製したHT-LCFの SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動

0.1%のSDSを含有する分離用ゲル(17.5%アクリルアミド)を用いて、実施例2で得られた試料について電気泳動を行った。ゲル中の緩衝液として0.1% SDSを含む375mMトリス-HCl(pH8.8)緩衝液、泳動槽中の緩衝液として25mMトリス-200mMグリシン(pH6.8)緩衝液を用いた。15mAの定電流で1時間泳動した後に、ゲル中の蛋白質を銀染色キット(バイオラッド社製)で染色した。

結果を図2に示す。標準分子量マーカーの分子量(kDa)を左側に記載した。レーン上段のM.W.S.t.d.は標準分子量マーカー、A, B, C, DはHPLCで溶出された4つのピークフラクションにそれぞれ対応する。標準分子量マーカーとの相対的位置から算定した結果、4つのピークとも分子量12,000~15,000の位置に蛋白質バンドが観察された。

[実施例 4] HT-1376細胞の培養液から精製したHT-LCFのアミノ酸配列の決定

精製したHT-LCF約20μgを0.5μgのリシルエンドペプチダーゼ(シグマ社製)とともに0.05Mトリス-HCl(pH8.5)緩衝液(100μl)中で、水浴を用いて37°C 20時間のインキュベーションを行った。エバボレーターによって乾燥後、TSK ODS 120TC18逆相HPLCカラムを用いて部分ペプチドを分離した。逆相クロマトグラフィーは、実施例2の逆相クロマトグラフィーと径が24mmの大口径のカラムを使用したことを除いて同一条件で行った。精製したHT-LCFおよび部分ペプチドのアミノ酸配列を(株)島津製作所社製PSQ-1気相プロテインシークエンサーを用いて自動エドマン分解を行った。その結果、以下に示すようなアミノ酸配列が決定された。

アミノ末端：配列番号No. 5のアミノ酸配列

Fr. 26：配列番号No. 6のアミノ酸配列

Fr. 32：配列番号No. 7のアミノ酸配列

Pr. 38：配列番号No. 8 のアミノ酸配列

アミノ末端：配列番号No. 9 のアミノ酸配列

Fr. とは逆相クロマトグラフィーにて溶出した画分（フラクション）を表す。

なお、アミノ末端の配列には配列番号No. 9 のアミノ酸配列で示される 1 残基目のアラニンを欠く、システインから始まる配列も同時に解析された。その存在比は、アラニンから始まるもの 1 に対して、システインから始まるもの 3 の割合であった。

〔実施例 5〕 縮重オリゴヌクレオチドプライマーの設計と調製

実施例 4 において決定したアミノ酸配列をもとにそれらをコードすると考えられる塩基配列の組み合わせを予想した。更に、それらの組み合わせのうちから、ヒトにおいて使用頻度の高いコドンを選び、縮重プライマー 1 及び 2 を設計した（図 3）。すなわち、プライマー 1 は、アミノ末端配列より 20 ヌクレオチド、14 ミックスを、プライマー 2 は、Pr. 38 配列より 17 ヌクレオチド、32 ミックスをそれぞれ設計した。ヒトにおけるコドンの使用頻度は Wada ら、 Nucleic Acids Res., 18, 2367-2411, 1990 を参照した。

設計したプライマーはアプライドバイオシステムズ社 (A B I) 製 DNA 自動合成機型式 3 8 0 B を用いて合成し、同社製の合成DNA精製用 O P C カラムを使用して精製した。合成立びに精製は説明書に従って行った。精製したDNAは T E バッファー (10 mM トリス、1 mM EDTA, pH 7.4) に 50 μM となるよう溶かし、使用時まで -20°C に凍結保存した。

〔実施例 6〕 HT-1376 細胞からのmRNAの調製と cDNAへの変換

HT-1376 細胞は 5 % のウシ胎児血清を含む D M E M 培地で培養した。細胞が培養フラスコ [FALCON (登録商標) フラスコ、培養面積 175 cm², No. 3028; Becton Dickinson (ベクトン ディッキンソン) 社製] の培養面積を全ておおうまで培養 (48 時間) 後、LPS を最終濃度 10 μg/ml となるように加え 12 時間培養した。培養後培地を取り除き、得られた細胞約 5 × 10⁸ 個を P B S で一回洗

浄した後、Chomczynski らのAGPC法（Acid Guanidium Phenol Chroloform Method: Anal. Biochem., 162:156-159, 1987）で全RNAを抽出した。

約 5×10^8 個の細胞に40mlの変性溶液（4Mグアニンチオシアネート、25mM クエン酸ナトリウム、0.5%サルコシル、0.1M 2-メルカプトエタノール、pH 7.0）を加えて細胞を溶解させた後、4mlの2M酢酸ナトリウム、40mlの水飽和フェノール、8mlのクロロホルムを加えて振拌した。氷中に15分静置後 10,000×g、20分間4℃で遠心し、その後水相を回収し、40mlのイソプロパノールを加えて-20℃に1時間静置した。10,000×g、20分間4℃で遠心後上清を捨て、ペレットを5mlの変性溶液に溶かし、5mlのイソプロパノールを加えて-20℃に1時間静置した。10,000×g、20分間4℃で遠心後、75%のエタノールでペレットをリンスした後自然乾燥させ、1mlのTEバッファーに溶解させた。このようにして得られたRNA量は約5mgであった。このRNAのうち1μgを用いてcDNAを合成した。cDNAの合成には、200μMのdNTP（dATP, dCTP, dGTP, dTTPから成る4種デオキシヌクレオシド三リン酸；宝酒造社製）、20ユニットのRNアーゼ阻害剤（ベーリングガーマンハイムヤマノウチ社製）、1μMのランダムプライマー（宝酒造社製）、200ユニットの逆転写酵素（MMLV由来、BRL社製）を使用し（反応液量 20μl）、37℃で90分間保温後70℃で10分間加熱して酵素を失活させ、-20℃で使用時まで凍結保存した。

〔実施例7〕 HT-1376細胞cDNAを錆型とするPCRの実施

実施例6で合成したcDNA 1μlを錆型としてPCRを実施した。プライマーには実施例5で設計し合成したオリゴマーを終濃度各2μMで使用した。反応系は100μlで行い、上記の他に200μM dNTP、AmpliTaq（登録商標）DNAポリメラーゼ用反応バッファー [10mMトリス-HCl(pH8.3), 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.001%ゼラチンを含有]、AmpliTaqDNAポリメラーゼ10ユニットを加えた〔これらはPerkin-Elmer Cetus Instruments社製（以下「パーキンエルマーシータス社製」とする）のGeneAmp（登録商標）PCR リージェントキット（Reagent Kit）を使用した〕。

反応は、順に92℃1分間、40℃1分間、72℃2分間の条件を1サイクルとして

これを30サイクル、DNA サーマルサイクラー (Thermal Cycler; パーキンエルマーシータス社製) を用いて行った。

[実施例 8] PCR断片のベクターへのサブクローニングと塩基配列の決定

実施例 7 で行ったPCR反応液100 μ lのうち10 μ lを2%のアガロースゲル中で電気泳動後エチジウムプロマイドによってDNAを染色した結果、170塩基対(以下、「塩基対」を「bp」とする)位のDNA断片が観察された。そこで、この反応液を等量のクロロホルムで一回抽出後、5M NaCl 20分の1量及び2倍量のエタノールを加えてDNAを沈殿させた。このDNAを50mMトリス緩衝液(pH 7.6)、10mM塩化マグネシウム、10mM 2-メルカプトエタノール、100 μ M ATPの組成を持つ溶液 20 μ lに溶かし、10UのT4ポリヌクレオチドキナーゼ(宝酒造社製)を加えた後37°Cで30分間反応させた。70°C10分間加熱後、終濃度が各250 μ MとなるようにdNTPを加え、更に5UのT4DNAポリメラーゼ(宝酒造社製)を加えて37°C30分間反応させた。70°C10分間加熱後、等量の水飽和フェノールで1回抽出した後エタノール沈殿によってDNAを回収した。回収したDNAを20 μ lのTEバッファーに溶かし、うち2 μ lを10ngの平滑末端を持つクローニングベクター(制限酵素Sma Iで消化したpUC13; ファルマシア社製)とライゲイション(宝酒造社製DNA Ligation Kit: Nucleic Acids Res., 14, 7617-7631, 1986; を説明書通りに使用した)した後、10分の1量を大腸菌コンピテントセルJM109(Gene, 33, 103-119, 1985, ATCC No. 53323; 宝酒造社製)の説明書に従って導入後、抗生物質アンビシリン(100 μ g/ml)を含む寒天培地上で16時間培養し、コロニーを生育させた。これらのコロニーからランダムに3個を選び培養(16時間, 37°C)後、プラスミドDNAをアルカリSDS法(Nucleic Acids Res., 7, 1513-1523, 1979)で抽出し、その塩基配列を 32 Pで放射標識を行うジデオキシ法で決定した(Sangerら、Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 74, 5463-5467, 1977)。プライマーには宝酒造社製の正方向(M4)並びに逆方向(RV)プライマーを利用した。その結果3個のプラスミドの配列は一致し、両末端にPCRに用いたプライマーの配列を持ち、内部に精製した蛋白質から決定し

たアミノ酸配列に対応する塩基配列が確認された。

結果を配列番号No. 4に示す。

アミノ酸配列に対応する塩基配列部分は、配列表中、配列番号No. 4のアミノ酸配列番号の第1～8番目、第41～47番目、及び第50～55番目であった。

従って、ここでサブクローニングされたDNA断片はHT-LCFCcDNAの一部をコードするDNA断片であると考えられた。そこで、このDNA断片をcDNAのスクリーニング用のプローブとして用いることとし、プラスミドDNAを大量に調製した。調製したDNAはTEバッファーに溶解後、制限酵素EcoRI並びにBamHIで消化し、2%のSea Plaque Agarose（宝酒造社製；登録商標）で泳動後、切断された約170bpの断片を切り出し、65°C10分間加熱しゲルを溶解後、等量の水飽和フェノールで3回抽出後エタノール沈殿を行って精製し、実施例10でのスクリーニングのためのプローブとして使用した。

〔実施例9〕 HT-1376細胞cDNAライブラリーの作製

cDNAライブラリー作製のためのmRNA調製の材料としては、LPS処理後12時間目のHT-1376細胞を使用した。この細胞約 5×10^8 個よりAGPC法により全RNAを抽出した。このRNA 500μgを500μlのTEバッファーに溶解後、Oligotex-dT30（登録商標；宝酒造社製；Nucleic Acids Res. Symp. ser. no. 19, 61-64, 1988）を用いてポリア⁺RNAを精製した（方法は説明書に従った）。精製したポリア⁺RNA 5μgを使用してcDNAを合成した。プライマーにはオリゴdTを用い、cDNA合成システムプラス（アマーシャム社製；Gene, 25, 263-269, 1983）を使用してcDNAを合成した。合成したcDNAは平滑末端とした後、制限酵素EcoRI及びNotIの配列を含むアダプター（ファルマシア社製）を付加した。アダプターを付加したcDNAは末端を磷酸化した後、EcoRI消化したファージベクターλZAPIIアーム（ストラタジーン社製；登録商標）に導入しパッケージング後[GIGAPACK（登録商標）II ゴールドを説明書通りに使用；ストラタジーン社製]、宿主菌XL-1Blue株（ストラタジーン社製；Biotechniques, 5, 376, 1987）に形質導入し、ファージplaquesを形成させ、 5×10^5 個のcDNAライブラリーを作製した。

[実施例 10] PCR断片をプローブとするcDNAライブラリーのスクリーニング

実施例9で作製したcDNAライブラリーを直径15cmのペトリ皿中の寒天培地上に約2万個となるようにまき、37°Cで培養し、ブラークが確認できるようになるまで成長させた。上記プレートを10枚調製後、ナイロンフィルター(Colony/Plaque Screen: デュボン社製; 登録商標)へ転写した。転写したフィルターは1.5M NaCl, 0.5M NaOHの溶液中に2分間、1.5M NaCl, 0.5Mトリス-HCl(pH8.0)溶液中に5分間、0.2Mトリス-HCl(pH7.5), 2×SSC溶液[SSCとは0.15M NaCl, 0.015Mクエン酸ナトリウムを含む水溶液(pH 7.0)をいう。2×SSCとはその2倍の濃度のものをいう。]中に30秒間順次浸漬したのち、真空オーブン中で80°C 2時間加熱した。これらのフィルターをハイブリッド溶液[0.8M NaCl, 20mMピベス(pH6.5), 50%ホルムアミド, 0.5% SDS, 及び100μg/mlサケ精子由来DNA]中で42°C 2時間保温後、ランダムプライマー-DNAラベリングキット(登録商標; 宝酒造社製; Anal. Biochem., 132, 6-13, 1983)を用いて³²PラベルしたDNAプローブ(実施例8参照)10⁷cpmを含むハイブリッド溶液中で42°C 20時間保温した。その後2×SSC, 0.1% SDSを含む溶液中で42°C 15分間の洗いを2回行った。フィルターを増強スクリーン及びイーストマンコダックカンパニー(EASTMAN KODAK COMPANY)製X-OMAT(登録商標)ARフィルムにより-70°C 16時間オートラジオグラフィーに付した。このオートラジオグラフの結果23個の陽性シグナルが得られた。陽性シグナルを含む領域をマスタープレートから拾い上げ二次スクリーニングに移った。二次スクリーニングの条件は一次スクリーニングのものと同一であった。その結果、3個の強いシグナルが得られた。これらのクローンは同一の制限酵素パターンを示したが、長さが一部異なっていた。最長の長さを持つクローンを塩基配列決定のために選択した。

[実施例 11] HT-LCF cDNAの塩基配列

実施例10で得たファージクローンを大量に培養し、SambrookらのMolecular

Cloning, 2nd. edition, 2. 60-2. 80, 1989の方法でファージDNAを調製した。このDNAを制限酵素Not Iで消化したところ、cDNA内部にはNot Iの認識配列は存在せず、Not I消化によってcDNA断片がそのまま切り出されることが明らかとなった。そこで、この約3.5kbpのcDNA断片のみを回収しプラスミドベクターpBluescript II（登録商標：ストラタジーン社製）のNot I部位に導入した。

³²Pを用いたジデオキシ法により、サブクローニングしたDNA断片の両末端より塩基配列の解析を行った。更に内部の配列決定は解析した部分の配列をもとに合成したプライマーを使用して同様にジデオキシ法で決定した。DNAの相補鎖の配列を比較する事で解析した塩基配列の確認を兼ねた。

その結果、サブクローニングしたcDNA断片約3,500bpの全塩基配列が決定された。

結果を配列番号No. 3に示す。

このcDNA断片は唯一の長いオープンリーディングフレームをコードしており、コードされるアミノ酸配列もあわせて配列表の配列番号No. 3に示した。

精製されたペプチドのアミノ酸配列に対応する部分は、配列表中のアミノ酸配列番号の第1～21番目、第54～60番目、第63～69番目、第78、79、81～84番目、及び第86～87番目であった。

実施例4で決定したアミノ酸配列は全てcDNAから予想される配列に含まれており、ここで得られたcDNAクローンは目的のものである事が確認された。また、プローブとして用いたPCR断片はクローニングされたcDNAの196～362塩基目にあたることが確認された。

[実施例12] Cos1細胞でのHT-LCFの発現

動物細胞での高効率発現ベクターpCDL-SR α 298（武部ら、Mol. Cell Biol., 8, 466-472, 1988, ; 以下「SR α 」とする）にクローニングしたcDNA全体を導入した。制限酵素Not Iで切り出されるcDNA断片をSR α に導入するため、SR α のPst I部位にNot Iリンカー(5' GCGGCCGCTGCA3' : ABI社製DNA自動合成機にて合成)をつなぎこんだ。このNot I部位に同制限酵素で

消化したcDNA断片を導入し、プロモーターの向きと同方向につながっているプラスミドクローンを選択し、発現実験に供した。Cos1細胞に導入するためのDNA調製は実施例8と同様に行った。DNAの導入担体としてはTRANSFECTAM（登録商標：IBF；Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 86, 6982-6986, 1989）を説明書通りに使用した。すなわち、直径10cmの培養皿あたり10mlの培養液（インスリン5μg/ml, トランスフェリン5μg/ml, モノエタノールアミン10μM, 亜セレン酸ナトリウム 2.5×10^{-8} Mを含むIMDM：イスコフ改変DMEM）を用い、そこに10μgのプラスミドDNAと30μlのTRANSFECTAM溶液（10%エタノール水溶液）を混ぜたものを加え、37°Cで培養した。72時間後に培養液を回収し、HT-LCF精製用のサンプルとした。この導入実験を繰り返し、培養上清を900mlプールした。回収した上清は、1,500×g, 10分間室温で遠心し、沈殿を除いた後-70°Cで使用するまで凍結保存した。以下、Cos1細胞の培養液から精製した「Cos1細胞由来遺伝子組換え型HT-LCF」を「rHT-LCF」と表すことにする。

[実施例13] rHT-LCFの精製

Cos1細胞の培養液約900mlをミリQ水（脱イオン水）で2倍希釈した後塩酸でpHを5.6まで下げ、25mMクエン酸-25mM NaCl(pH5.6)緩衝液で平衡化したCM-Sepharose（登録商標）CL-6Bカラムに通した。同緩衝液で洗浄した後、0.8M NaClまで塩濃度を上げたバッファーで一段階溶出を行った。溶出する蛋白質のピークを集め、蒸留水に対して透析した。凍結乾燥後の試料をPBSで平衡化したSuperdex（登録商標）H75ゲルろ過カラム（ファルマシア社製）に通した。単球又はマクロファージに対し遊走活性を誘導する画分を集め、蒸留水に対して透析を行った（4°C, 20時間）。凍結乾燥後、試料をフェニル5PW RP逆相HPLCカラム（トーソー社製；4.6×75mm）に通し最終精製を行った。すなわち、溶離液Aとして0.05%TFA溶液、溶離液Bとして0.05%TFAを含有する80%アセトニトリル溶液を用い、60分間に0%から50%までアセトニトリル濃度を直線的に増加させて蛋白質を溶出させた。溶出液は220nmの波長を用いてモニターした。流速は1ml/分で行い、単球又はマクロファージに対し

て遊走活性を誘導するピークを分取した。

最終的に精製された rHT-LCF は 100~200 μg であった。

[実施例 14] rHT-LCF の SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動
0.1% の SDS を含有する分離ゲル (17.5% アクリルアミド) を用いて、実施
例 13 で得られた試料について電気泳動を行った。ゲル中の緩衝液として 0.1%
SDS を含む 375mM トリス-HCl (pH 8.8) 緩衝液、泳動槽中の緩衝液として 25mM
トリス-192mM グリシン (pH 8.3) 緩衝液を用いた。200V の定電圧で 45 分間泳動し
た後に、蛋白質をクマシーブリリアントブルーで染色した。マーカーの分子量を
左側に示す。分子量マーカーとの相対的位置から算定して、分子量 12,000~15,0
00 の位置に単一バンドが確認された (図 4)。

[実施例 15] rHT-LCF のアミノ酸配列の決定

実施例 4 の方法と同様にしてアミノ末端のアミノ酸配列の決定を行った。その
結果、配列番号 No. 10 に示すアミノ酸配列が確認された。

[実施例 16] rHT-LCF の C 末端部分アミノ酸配列及びジスルフィ ド結合形成部位の決定

rHT-LCF の精製品 30 μg を 0.05M 酢酸アンモニア緩衝液 (pH 4.0) 中で V
8 プロテアーゼ (0.8 μg) と 37°C で 18 時間保温した。このサンプルを ODS 120T
C18 (トーソー社製) を用いた逆相 HPLC を行い、生成したペプチドを分離し
た。溶出は A 液に 0.05% TFA 溶液、B 液に 80% アセトニトリルを含む 0.05% T
FA 溶液を用い、60 分間に 0% から 50% までアセトニトリル濃度を直線的に増加
させて蛋白質を溶出させた。cDNA の塩基配列から推定される rHT-LCF
のアミノ酸配列の V8 プロテアーゼによる予想限定分解箇所を下記に示す。

ペプチド #1 : 配列番号 No. 11 のアミノ酸配列

ペプチド #2 : 配列番号 No. 12 のアミノ酸配列

ペプチド #3 : Glu

ペプチド #4 : 配列番号 No. 13 のアミノ酸配列

ペプチド#5：配列番号No. 1~4のアミノ酸配列

ペプチド#6：配列番号No. 1~5のアミノ酸配列

ペプチド#7：配列番号No. 1~6のアミノ酸配列

その結果、未分解のrHT-LCFのピークを含めて、5つの部分ペプチドのピークが確認できた（図5）。図5は、逆相HPLCにおいて0~40%のアセトニトリルによる溶出パターンを示す。

溶出する順番にピークA, B, C, D及びE（未分解rHT-LCF）とし、実施例4の方法と同様にしてそれぞれのピークのN末端アミノ酸配列の決定を行った結果を下記に示す。

ピークA：配列番号No. 1~7（ペプチド#6の一部）のアミノ酸配列

ピークB：配列番号No. 1~8（ペプチド#2）のアミノ酸配列

ピークC：配列番号No. 1~9（ペプチド#5）のアミノ酸配列

ピークD (1)：配列番号No. 2~0（ペプチド#1）のアミノ酸配列

ピークD (2)：配列番号No. 2~1（ペプチド#3とペプチド#4の一部）のアミノ酸配列

ピークDでは、ペプチド#1と#4にはシステイン（cysteine）が一残基ずつあり、ジスルフィド結合が形成されているために同時に溶出した。エドマン分解の1サイクル目には検出できなかったシスチン（cystine）の分解ピークが、2サイクル目に検出できた事から、ジスルフィド結合を形成している事を確認した。ペプチド#3はグルタミン酸一残基であるが、遊離せずペプチド#4に結合したままであった。また、ペプチド#6よりもC末端側に位置するペプチド#7以降のペプチドは確認できなかった。

従って、確認された部分ペプチドの中で最もC末端側のものは、ピークAのペプチド#6に相当する部分であったが、予想されるC末端の2残基であるアルギニン、グルタミン酸を確認することができなかった。

以上のことから、rHT-LCFのC末端アミノ酸は、ペプチド#6のトレオニン（全体ではN末端のシステインから数えて94残基目）であることがわかった。

〔実施例 17〕 質量分析による rHT-LCF の C 末端部の決定

質量分析装置（フィニガンマット社製；TSQ-700）を用いてエレクトロンスプレーイオン化法により、rHT-LCF 及び実施例 16 で得られたピーク A の質量分析及び、ピーク A のアミノ酸配列の決定を行った。測定された rHT-LCF 及びピーク A ベプチドの平均質量は、それぞれ 10,780.7（図 6）及び 1,349.1（図 7）で、実施例 16 で得られた 94 残基より構成され、かつ 1 本のジスルフィド結合を持つと仮定した理論値の 10,783.5 及び 1,348.8 とほぼ一致した。また、ピーク A の一次構造は、配列番号 No. 22 で示されるとおりで、実施例 16 で得られた結果と一致した。従って、rHT-LCF は実施例 16 の結果と同じく、システインから始まり 94 残基目のトレオニンで終わる構造である事がわかった。

〔実施例 18〕 rHT-LCF の単球又はマクロファージに対する遊走活性の測定

実施例 1 の方法を用いて、精製した rHT-LCF について単球又はマクロファージの遊走活性を測定した。その結果、広い用量範囲（0.01～100nM）で用量依存的に単球又はマクロファージの遊走を引き起こしていることが確認された（図 8）。図中、横軸はボイデンチャンバー下室に入れた精製 rHT-LCF の濃度を、縦軸は染色したフィルターを顕微鏡下で 5 視野分観察し計測された単球又はマクロファージの総数を示す。

〔実施例 19〕 rHT-LCF の好中球に対する遊走活性の測定

ヒト末梢血白血球は以下の様に調整した。血液 100ml に 3.5% のデキストラン T-500 を含む生理食塩水 100ml を加え室温で 30 分間静置し、上層の白濁部分を回収後遠心し（1,200rpm, 5 分間, 4°C）、沈殿させた。沈殿を 0.2% NaCl 30ml に懸濁後、1.6% NaCl 30ml を加え、攪拌後遠心した（1,200rpm, 5 分間, 4°C）。沈殿を 20ml の PBS に懸濁し、30ml の Ricoll-Paque 液に両者が混じり合わないように静かに重層して遠心（1,300rpm, 15 分間, 室温）後、得られた沈殿を好中球分画として回収した。

回収した細胞をRPMI 1640培地に懸濁し、遠心を行った(1,200rpm, 5分間, 室温)。得られた沈殿を1mlあたり100~150万個の細胞密度となるようにRPMI 1640培地に懸濁した。その細胞浮遊液50μlを48穴マイクロケモタキシスチャンバーの上室に入れ、下室には精製したrHT-LCFを含む検体を25μl入れた。フィルターはポリカーボネート製で、3μmの小孔を持つものを用いた。この装置を5%CO₂インキュベーター内にて37°Cで3時間インキュベーションした。インキュベーション後、下室に遊走した細胞をコールターカウンターを用いて粒子径6.267μm以上の細胞を好中球としてカウントした。その結果、精製したrHT-LCFは全ての濃度において好中球を遊走しなかった(図9)。図9中、横軸はボイデンチャンバー下室に入れた精製rHT-LCFの濃度を、縦軸は下室に遊走した好中球の総数を上室に入れた細胞に対する%(遊走率)で表示した。

[実施例20] HT-LCFの大腸菌での発現と精製

遊走活性を担うと考えられた蛋白質部分(配列番号No.2で示されるアミノ酸配列を実質的に含む蛋白質)を大量に得る目的で大腸菌での発現を行った。この蛋白質に対応するDNA断片を大腸菌用発現ベクターに挿入し、発現に供した。DNA断片の取得にはPCRを利用した。PCRに用いたプライマーは図10の通りであり、ベクターへのつなぎこみに便利なようにそれぞれの5'側末端に制限酵素配列を付加した。また、N末端側のプライマーにおいては最初のアミノ酸であるアラニンの前にメチオニンのコドン(ATG)を導入し、制限酵素としてNco I部位(CCATTGG)を付加した。C末側のプライマーにおいては、最後のアミノ酸であるアルギニンの直後に停止コドン(TAA)を付加し、その後にBamH I部位(GGATCCC)を導入した。これらプライマーは、実施例5と同様AB1社製DNA自動合成機を用いて合成し、実験に使用した。PCRの錆型には、配列番号No.3で示されるcDNA断片を含むプラスミドDNAを10ng使用した。反応条件は実施例7と同様であるが、アニーリング温度のみ変更し、45°Cで行った。ここで得られた330 bp前後のバンドを回収し、制限酵素Nco I及びBamH Iで消化後、同様に制限酵素で消化した大腸菌用発現ベクターpTrc99

A (ファルマシア社製: コード番号27-0971-01) につなぎ込み、Hanahan らの方法 (J. Mol. Biol., 166, 557-580, 1983) によりコンピテントにした宿主大腸菌Y A 2 1 (Mutch N. ら、J. Bacteriol., 136, 693-699, 1978) に導入した。得られた形質転換体のうち HT-L C F のDNA断片を含むクローンを選択し、HT-L C F 部分の塩基配列を決定した。

その結果、得られたクローン Y s HT 2 1 は、メチオニンで始まり、配列番号 No. 2 で示される HT-L C F のアミノ酸 1 番 (アラニン) から 105 番目 (アルギニン) までを含み、直後に停止コドンを持つ目的の DNA が発現ベクターに組み込まれたものであることが確認された (配列番号 No. 2 3)。また、途中の配列に、読み間違い等に起因する塩基の置換等は認められなかった。

このクローン Y s HT 2 1 を 10 リットルの LB 培地で振盪培養し (37°C) 、60 0 nm の吸光度が 0.8 になった時点で Isopropyl beta-D-Thiogalactoside (I P T G : 終濃度 1 mM) を加え、更に 5 時間培養した。培養後、遠心分離により菌体を回収し、1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (P M S F ; 和光純薬; No. 1 64-12181) を含む 6 M 塩酸グアニン (和光純薬; No. 070-01825) 溶液に懸濁した。懸濁液を 20 ml ずつプラスチック遠心管に分注し、菌体の超音波破碎処理を行った。即ち、超音波発振機 Sonifier model 250 (BRANSON) にマイクロチップを装着し、氷冷した懸濁液中に入れてから出力を上げ、2 分間処理後懸濁液を再び氷冷して更に 2 分間処理した。処理後の懸濁液の一部を採って検鏡し、菌体の破碎を確認した後、懸濁液を遠心し、上清を蒸留水に対して透析した。

更に、25 mM クエン酸 - 25 mM NaCl (pH 5.6) で平衡化した後、透析時に析出した不溶物を遠心分離で除去した。

25 mM クエン酸 - 25 mM NaCl (pH 5.6) で平衡化した CM-Sepharose - C L - 6 B (ファルマシア社製; No. 17-0720-01) カラム (25 × 200 mm) に試料を通し、洗浄後塩濃度を 0.8 M の濃度まで直線的に上昇させることにより蛋白質を溶出させた。溶出後は 20 ml づつ分取し 280 nm の波長に対し吸収を示すフラクションを探って 10 mM 酢酸に対して透析した。凍結乾燥させた後、試料を COSMOSIL 5C1 8-AR-300 逆相 H P L C カラム (ナカライトスク社製、10 × 250 mm) を用いて精製した。即ち、溶離液 A として 0.05% T F A 溶液 (和光純薬; No. 206-10731) 、溶

離液Bとして0.05% TFA溶液を含有する80%アセトニトリル（和光純薬；No. 019-08631）溶液を用い、60分間に0%から50%までアセトニトリル濃度を直線的に増加させ蛋白質を溶出させた。溶出液は220nmの吸光度をモニターした。流速は3.5 ml/分で行った。溶出する蛋白質をピークごとに分画し、島津P SQ-1プロテインシーカンサーを用いてN末端アミノ酸配列の分析を行った。その結果、HT-LCFのN末端アミノ酸配列10残基が一致するピークを得た。即ち、配列番号No. 3で示すところの、アミノ酸番号1（アラニン）から10（プロリン）が検出され、この精製品は、大腸菌での発現を意図した配列番号No. 2記載された蛋白質と同一のN末端配列を持っていることが確認された。

この精製ピークには単球/マクロファージ遊走活性がみられなかつたが、これは大腸菌に発現させたHT-LCFが動物細胞に発現させたものとは異なる立体構造を持つことに起因すると考えられたので、それを修正するために以下のようにリフォールディング処理を行つた。

塩酸グアニジン3.1gを10ml蒸留水に溶解し、水酸化ナトリウム溶液を加えてpHを8に調製した。これに還元型グルタチオン（和光純薬；No. 073-02013）を61.5mg添加し攪拌した後、再度pH 8に調製した。更に、上記精製品を1mg/ml含む6M塩酸グアニジン溶液を1ml加え攪拌した後、酸化型グルタチオン（ナカライトスク；No. 170-10)12.3mgを添加し、pHを8に調製した。蒸留水を加え最終的に20mlにし、室温下で一晩放置した後、再度逆相HPLCカラムで分画し、単球/マクロファージに対し遊走活性を誘導するピークを得た。最終的に、大腸菌由来遺伝子組換え型HT-LCF（以下、「E-rHT-LCF」とする。）を6~9mg精製することができた。単球/マクロファージ遊走活性の試験を行い、最終的に得られたE-rHT-LCFが 10^{-11} Mから 10^{-7} Mの濃度で用量依存的に活性を有することを確認した（図11）。図11において、横軸はE-rHT-LCFの濃度を、縦軸は遊走細胞数を示す。

ここで得られたE-rHT-LCFの比活性は、Cos1細胞で発現させたrHT-LCFのものとほぼ同一のものであり、E-rHT-LCFの大量発現、精製、活性体取得方法が確立されたといえる。

〔実施例 21〕 E-rHT-LCF の創傷治療効果

E-rHT-LCF の創傷治療に対する効果を調べる目的で創傷治療法による試験を行った。実験は Schulte and Domenjoz らの方法に従った (Med. Pharmacol. Expt. 16, 453-458, 1967)。

体重 110~130 g の SD 系雄性ラットを 1 群 10 匹用いた。背部被毛をバリカンで除毛した後、硫化バリウム 4 容、トラガント末 (和光純薬; 206-02242) 1 容の懸濁液を塗布し、3 分後に洗浄して脱毛した。その後、エーテル麻酔下において、正中線に沿って左又は右 1.5 cm の皮膚切開を施した。切開部中央を 1 ヶ所縫合後、化膿防止にストレプトマイシンを筋注した。初回は E-rHT-LCF の生理食塩水溶解液を切開部に $100 \mu\text{l}$ 注入し、その後は E-rHT-LCF 含有クリームを 1 日 1 回 5 日間切開部位にミクロスパーテルを用いて 0.1 g 塗布した。対照群には初回は生理食塩水のみ、その後はクリーム基剤のみを注入又は塗布した。クリーム基剤の処方は以下の通り。

クリーム基剤 100 g 中

セタノール	8.0 g
ステアリルアルコール	2.0 g
流動バラフィン	7.0 g
MYS-40 (日光ケミカルズ)	3.0 g
プロピルバラベン	0.05 g
精製水	80.0 g

E-rHT-LCF は生理食塩水あるいは上記のクリーム基剤に $1 \mu\text{g/g}$ 又は $10 \mu\text{g/g}$ になるよう調製したものを実験に供した。4 日目に抜糸し、6 日目に頭部打撲後、放血により致死させ皮膚を剥離した。創傷部位が中央になるように $30 \times 10\text{mm}$ の皮膚切片を作製し、両端を牽引して創傷治癒部が開裂するまでの張力を FD ピックアップ (TB-612T; 日本光電) を用いて測定し、得られた値は Dunnett の多重比較検定を用い、危険率 5 % で検定した。

その結果、対照群の抗張力に対して $1 \mu\text{g/g}$ の濃度では治療促進傾向は観られたが有意ではなかった。しかしながら、 $10 \mu\text{g/g}$ の濃度では有意な治療促進効果が認められた (表 1 参照)。

表 1

	用 量 ($\mu\text{g}/\text{g}/\text{日}$)	サンプル数	抗張力 (g) 平均値±標準誤差	抗張力の上昇 (%)
対 照 (クリーム基剤のみ)	-	10	220±5.6	-
E-rHT-LCF	1	10	249.8±11.4	13.5
	10	10	255.5±11.2※	16.1

表1中、「※」は、試験群が対照群と比較して有意 ($p < 0.05$) な差を有することを意味する。

[実施例22] E-rHT-LCFの熱傷治療効果

E-rHT-LCFの熱傷に対する治療効果を調べる目的で以下の実験を行った。方法は主に鴨志田らの実験的熱傷治療実験に従った(臨床医薬、4巻、7号、1245-1251、1988)。

体重190~210gのSD系雄性のラットを1群10匹用いた。実施例21と同様に脱毛した。その後、ペントバルビタールナトリウム(40mg/kg;腹腔投与)麻酔下において、乾熱器で加熱したステンレス製円筒($\phi 10\text{mm} \times 5\text{mm}$)を用いて正中線に沿って2ヵ所に熱傷を作成した。熱傷は重篤な症状を想定し、ステンレス製円筒を300℃に加熱し、10秒間円筒の自重(6g)によって圧迫した。E-rHT-LCF含有クリームは、作成した熱傷部位及び周辺に1日1回15日間ミクロスパーテルを用いて塗布した。対照群にはクリーム基剤のみを塗布した。クリーム基剤の組成は実施例21に記載のものと同一である。

効果の判定は、熱傷部位の障害度を経時的に観察して、下記の熱傷障害度基準により1ヵ所につき0から5までのスコアを付け、熱傷部位2ヵ所の平均を求めた。更に、壊死組織又は上皮硬化組織の脱落に要した日数を算出した。得られた値はDunnetの多重比較検定を用い、危険率5%で検定した。

熱傷障害度基準

0 : 完全治癒(熱傷痕のみ)

1 : 上皮硬化組織が脱落し熱傷部位の潰瘍

- 2 : 上皮硬化組織一部脱落
- 3 : 热傷部位の壊死組織脱落
- 4 : 热傷部位の壊死組織一部脱落
- 5 : 热傷部位の組織壊死

その結果、热傷障害度においては $1 \mu\text{g/g}$ の濃度で塗布 6 日目より、 $10 \mu\text{g/g}$ では塗布 5 日目より有意な治療効果が認められた（表 2 参照）。

表 2

被検物質 (μg/g)	カリ-土中の濃度 (μg/g)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
カリ-基剤	-	5.00± 0.00	5.00± 0.00	5.00± 0.00	4.75± 0.11	4.50± 0.20	4.05± 0.17	3.65± 0.20	3.50± 0.21	3.30± 0.21	2.90± 0.27	2.35± 0.27	1.80± 0.35	1.60± 0.25	1.50± 0.23	1.50± 0.21
E-HT -LCP	1	5.00± 0.00	5.00± 0.00	5.00± 0.00	4.55± 0.17	4.00± 0.22	3.60± 0.16※	3.45± 0.16※	3.25± 0.16※	2.85± 0.08※	2.80± 0.08※	2.60± 0.16	2.25± 0.16	2.05± 0.16	1.59± 0.23	1.45± 0.26
E-HT -LCP	10	5.00± 0.00	5.00± 0.00	5.00± 0.00	4.45± 0.17	3.80± 0.15※	3.35± 0.15※	3.30± 0.15※	3.25± 0.11※	2.90± 0.08※	2.80± 0.11※	2.40± 0.15	2.35± 0.16	2.10± 0.16	1.85± 0.20	1.65± 0.22

また、壞死組織脱落日数においては両濃度とも有意に脱落日数の短縮が認められた。しかしながら、上皮硬化組織脱落日数においては、対照群に対して差は認められなかった（表3参照）。

表 3

	クリーム中の濃度 ($\mu\text{g/g}$)	壞死組織脱落日数 (平均値士標準誤差)	上皮硬化組織脱落日数 (平均値士標準誤差)
クリーム基剤	-	10.1±0.53	12.8±0.42
E-rHT-LCF	1	7.6±0.60※	13.0±0.49
E-rHT-LCF	10	7.7±0.75※	12.8±0.61

尚、表2及び表3に記載された「※」の意味は、表1の場合と同様である。

産業上の利用可能性

本発明により、従来にない新規な単球又はマクロファージ遊走因子を提供することができる。

本発明の遊走因子は、血清、血漿、尿や各種体液に含まれる本遊走因子の濃度測定時の対照物質とすることができます。すなわち、本発明の遊走因子を酵素免疫測定法（ELISA又はEIA）やラジオアイソトープを用いた免疫測定法（RIA）により測定するときの標準物質として用いられ得る。また、上記測定法の作製に不可欠な特異抗体作製時の抗原として用いられ得る。従って、感染防御システムにおいて遊走因子が関与する機構を解析することが可能となる。

また、本発明の遊走因子を各種感染症、各種免疫不全症、各種癌疾患に投与することにより、予防効果及び治療効果を得ることができる。

本因子はまた、様々な創傷（切り傷、手術の傷、床ズレ、火傷、潰瘍等）の治

療剤として用いることができる。更に、同様の効果を期待して他の治療剤・治療法（糖尿病、各種潰瘍、癌化学療法、各種手術等）と併用することで予防効果並びに治療効果を得ることができる。

配列表

配列番号：1

配列の長さ：94

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

起源：ホモ サピエンス (Homo Sapiens)

セルライン：HT-1376

配列：

Cys	Lys	Lys	Val	Ile	Leu	Asn	Val	Pro	Ser	Lys	Leu	Glu	Ala	Asp	Lys
1															15
Ile	Ile	Gly	Arg	Val	Asn	Leu	Glu	Glu	Cys	Phe	Arg	Ser	Ala	Asp	Leu
															30
Ile	Arg	Ser	Ser	Asp	Pro	Asp	Phe	Arg	Val	Leu	Asn	Asp	Gly	Ser	Val
															45
Tyr	Thr	Ala	Arg	Ala	Val	Ala	Leu	Ser	Asp	Lys	Lys	Arg	Ser	Phe	Thr
															60
Ile	Trp	Leu	Ser	Asp	Lys	Arg	Lys	Gln	Thr	Gln	Lys	Glu	Val	Thr	Val
															80
Leu	Leu	Glu	His	Gln	Lys	Lys	Val	Ser	Lys	Thr	Arg	His	Thr		94
															85
															90

配列番号：2

配列の長さ：105

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

起源：ホモ サピエンス (Homo Sapiens)

セルライン：HT-1376

配列：

Ala Cys Lys Lys Val Ile Leu Asn Val Pro Ser Lys Leu Glu Ala Asp			
1	5	10	15
Lys Ile Ile Gly Arg Val Asn Leu Glu Glu Cys Phe Arg Ser Ala Asp			
20	25	30	
Leu Ile Arg Ser Ser Asp Pro Asp Phe Arg Val Leu Asn Asp Gly Ser			
35	40	45	
Val Tyr Thr Ala Arg Ala Val Ala Leu Ser Asp Lys Lys Arg Ser Phe			
50	55	60	
Thr Ile Trp Leu Ser Asp Lys Arg Lys Gln Thr Gln Lys Glu Val Thr			
65	70	75	80
Val Leu Leu Glu His Gln Lys Lys Val Ser Lys Thr Arg His Thr Arg			
85	90	95	
Glu Thr Val Leu Arg Arg Ala Lys Arg			
100	105		

配列番号：3

配列の長さ：3551

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

起源：ホモ サピエンス (Homo Sapiens)

セルライン：HT-1376

配列：

GGCAGGCAGG TCTCGTCTCG GCACCCCTCCC GGCGCCCCGG TTCTCCTGGC CCTGCCCGGC 60		
ATCCCG ATG GCC GCC GCT GGG CCC CGG CGC TCC GTG CGC GGA GCC GTC 108		
Met Ala Ala Ala Gly Pro Arg Arg Ser Val Arg Gly Ala Val		
-30	-25	-20

TGC CTG CAT CTG CTG CTG ACC CTC GTG ATC TTC AGT CGT GCT GGT GAA 156
 Cys Leu His Leu Leu Leu Thr Leu Val Ile Phe Ser Arg Ala Gly Glu
 -15 -10 -5
 GCC TGC AAA AAG GTG ATA CTT AAT GTA CCT TCT AAA CTA GAG GCA GAC 204
 Ala Cys Lys Lys Val Ile Leu Asn Val Pro Ser Lys Leu Glu Ala Asp
 1 5 10 15
 AAA ATA ATT GGC AGA GTT AAT TTG GAA GAG TGC TTC AGG TCT GCA GAC 252
 Lys Ile Ile Gly Arg Val Asn Leu Glu Glu Cys Phe Arg Ser Ala Asp
 20 25 30
 CTC ATC CGG TCA ACT GAT CCT GAT TTC AGA GTT CTA AAT GAT GGG TCA 300
 Leu Ile Arg Ser Ser Asp Pro Asp Phe Arg Val Leu Asn Asp Gly Ser
 35 40 45
 GTG TAC ACA GCC AGG GCT GTT GCG CTG TCT GAT AAG AAA AGA TCA TTT 348
 Val Tyr Thr Ala Arg Ala Val Ala Leu Ser Asp Lys Lys Arg Ser Phe
 50 55 60
 ACC ATA TGG CTT TCT GAC AAA AGG AAA CAG ACA CAG AAA GAG GTT ACT 396
 Thr Ile Trp Leu Ser Asp Lys Arg Lys Gln Thr Gln Lys Glu Val Thr
 65 70 75 80
 GTG CTG CTA GAA CAT CAG AAG AAG GCA TCG AAG ACA AGA CAC ACT AGA 444
 Val Leu Leu Glu His Gln Lys Lys Val Ser Lys Thr Arg His Thr Arg
 85 90 95
 GAA ACT GTT CTC AGG CGT GCC AAG AGG AGA TGG GCA CCT ATT CCT TGC 492
 Glu Thr Val Leu Arg Arg Ala Lys Arg Arg Trp Ala Pro Ile Pro Cys
 100 105 110
 TCT ATG CAA GAG AAT TCC TTG GGC CCT TTC CCA TTG TTT CTT CAA CAA 540
 Ser Met Gln Glu Asn Ser Leu Gly Pro Phe Pro Leu Phe Leu Gln Gln
 115 120 125
 GTT GAA TCT GAT GCA GCA CAG AAC TAT ACT GTC TTC TAC TCA ATA ACT 588
 Val Glu Ser Asp Ala Ala Gln Asn Tyr Thr Val Phe Tyr Ser Ile Ser

130	135	140
GGA CGT GGA GTT GAT AAA GAA CCT TTA AAT TTG TTT TAT ATA GAA AGA 636		
Gly Arg Gly Val Asp Lys Glu Pro Leu Asn Leu Phe Tyr Ile Glu Arg		
145	150	155
GAC ACT GGA AAT CTA TTT TCC ACT CCG CCT GTG GAT CGT GAA GAA TAT 684		
Asp Thr Gly Asn Leu Phe Cys Thr Arg Pro Val Asp Arg Glu Glu Tyr		
165	170	175
GAT GTT TTT GAT TTG ATT GCT TAT GCG TCA ACT GCA GAT GGA TAT TCA 732		
Asp Val Phe Asp Leu Ile Ala Tyr Ala Ser Thr Ala Asp Gly Tyr Ser		
180	185	190
GCA GAT CTG CCC CTC CCA CTA CCC ATC AGG GTC GAG GAT GAA AAT GAC 780		
Ala Asp Leu Pro Leu Pro Leu Pro Ile Arg Val Glu Asp Glu Asn Asp		
195	200	205
AAC CAC CCT GTT TTC ACA GAA GCA ATT TAT AAT TTT GAA GTT TTG GAA 828		
Asn His Pro Val Phe Thr Glu Ala Ile Tyr Asn Phe Glu Val Leu Glu		
210	215	220
AGT AGT AGA CCT GGT ACT ACA GTG GGG GTG GTT TGT GCC ACA GAC AGA 876		
Ser Ser Arg Pro Gly Thr Thr Val Gly Val Val Cys Ala Thr Asp Arg		
225	230	235
GAT GAA CCG GAC ACA ATG CAT ACG CGC CTG AAA TAC AGC ATT TTG CAG 924		
Asp Glu Pro Asp Thr Met His Thr Arg Leu Lys Tyr Ser Ile Leu Gin		
245	250	255
CAG ACA CCA AGG TCA CCT GGG CTC TTT TCT GTG CAT CCC AGC ACA GGC 972		
Gln Thr Pro Arg Ser Pro Gly Leu Phe Ser Val His Pro Ser Thr Gly		
260	265	270
GTA ATC ACC ACA GTC TCT CAT TAT TTG GAC AGA GAG GTT GTA GAC AAG 1020		
Val Ile Thr Thr Val Ser His Tyr Leu Asp Arg Glu Val Val Asp Lys		
275	280	285
TAC TCA TTG ATA ATG AAA GTA CAA GAC ATG GAT GGC CAG TTT TTT GGA 1068		

Tyr Ser Leu Ile Met Lys Val Gln Asp Met Asp Gly Gln Phe Phe Gly
290 295 300
TTG ATA GGC ACA TCA ACT TGT ATC ATA ACA GTC ACA GAT TCA AAT GAT 1116
Leu Ile Gly Thr Ser Thr Cys Ile Ile Thr Val Thr Asp Ser Asn Asp
305 310 315 320
AAT GCA CCC ACT TTC AGA CAA AAT GCT TAT GAA GCA TTT GTA GAG GAA 1164
Asn Ala Pro Thr Phe Arg Gln Asn Ala Tyr Glu Ala Phe Val Glu Glu
325 330 335
AAT GCA TTC AAT GTG GAA ATC TTA CGA ATA CCT ATA GAA GAT AAG GAT 1212
Asn Ala Phe Asn Val Glu Ile Leu Arg Ile Pro Ile Glu Asp Lys Asp
340 345 350
TTA ATT AAC ACT GCC AAT TGG AGA GTC AAT TTT ACC ATT TTA AAG GGA 1260
Leu Ile Asn Thr Ala Asn Trp Arg Val Asn Phe Thr Ile Leu Lys Gly
355 360 365
AAT GAA AAT GGA CAT TTC AAA ATC AGC ACA GAC AAA GAA ACT AAT GAA 1308
Asn Glu Asn Gly His Phe Lys Ile Ser Thr Asp Lys Glu Thr Asn Glu
370 375 380
GGT GTT CTT TCT GTT GTC AAG CCA CTG AAT TAT GAA GAA AAC CGT CAA 1356
Gly Val Leu Ser Val Val Lys Pro Leu Asn Tyr Glu Glu Asn Arg Gln
385 390 395 400
GTG AAC CTG GAA ATT GGA GTC AAC AAT GAA GCG CCA TTT GCT AGA GAT 1404
Val Asn Leu Glu Ile Gly Val Asn Asn Glu Ala Pro Phe Ala Arg Asp
405 410 415
ATT CCC AGA GTG ACA GCC TTG AAC AGA GCC TTG GTC ACA GTT CAT GTG 1452
Ile Pro Arg Val Thr Ala Leu Asn Arg Ala Leu Val Thr Val His Val
420 425 430
AGG GAT CTG GAT GAG GGG CCT GAA TGC ACT CCT GCA GCC CAA TAT GTG 1500
Arg Asp Leu Asp Glu Gly Pro Glu Cys Thr Pro Ala Ala Gln Tyr Val
435 440 445

CGG ATT AAA GAA AAC TTA GCA GTG GGG TCA AAG ATC AAC GGC TAT AAG 1548
Arg Ile Lys Glu Asn Leu Ala Val Gly Ser Lys Ile Asn Gly Tyr Lys
450 455 460

GCA TAT GAC CCC GAA AAT AGA AAT GGC AAT GGT TTA AGG TAC AAA AAA 1596
Ala Tyr Asp Pro Glu Asn Arg Asn Gly Asn Gly Leu Arg Tyr Lys
465 470 475 480

TTG CAT GAT CCT AAA CGT TGG ATC ACC ATT GAT GAA ATT TCA GGG TCA 1644
Leu His Asp Pro Lys Gly Trp Ile Thr Ile Asp Glu Ile Ser Gly Ser
485 490 495

ATC ATA ACT TCC AAA ATC CTG GAT AGG GAG GTT GAA ACT CCC AAA AAT 1692
Ile Ile Thr Ser Lys Ile Leu Asp Arg Glu Val Glu Thr Pro Lys Asn
500 505 510

GAG TTG TAT AAT ATT ACA GTC CTG GCA ATA GAC AAA GAT GAT AGA TCA 1740
Glu Leu Tyr Asn Ile Thr Val Leu Ala Ile Asp Lys Asp Asp Arg Ser
515 520 525

TGT ACT GGA ACA CTT GCT GTG AAC ATT GAA GAT GTA AAT GAT AAT CCA 1788
Cys Thr Gly Thr Leu Ala Val Asn Ile Glu Asp Val Asn Asp Asn Pro
530 535 540

CCA GAA ATA CTT CAA GAA TAT GTA GTC ATT TGC AAA CCA AAA ATG GGG 1836
Pro Glu Ile Leu Gln Glu Tyr Val Val Ile Cys Lys Pro Lys Met Gly
545 550 555 560

TAT ACC GAC ATT TTA GCT GTT GAT CCT GAT GAA CCT GTC CAT GGA GCT 1884
Tyr Thr Asp Ile Leu Ala Val Asp Pro Asp Glu Pro Val His Gly Ala
565 570 575

CCA TTT TAT TTC AGT TTG CCC AAT ACT TCT CCA GAA ATC AGT AGA CTG 1932
Pro Phe Tyr Phe Ser Leu Pro Asn Thr Ser Pro Glu Ile Ser Arg Leu
580 585 590

TGG AGC CTC ACC AAA GTT AAT GAT ACA GCT GCC CGT CTT TCA TAT CAG 1980
Trp Ser Leu Thr Lys Val Asn Asp Thr Ala Ala Arg Leu Ser Tyr Gln

595	600	605
AAA AAT GCT GGA TTT CAA GAA TAT ACC ATT CCT ATT ACT GTA AAA GAC 2028		
Lys Asn Ala Gly Phe Gln Glu Tyr Thr Ile Pro Ile Thr Val Lys Asp		
610	615	620
AGG GCC CCC CAA GCT GCA ACA AAA TTA TTG AGA GTT AAT CTG TGT GAA 2076		
Arg Ala Gly Gln Ala Ala Thr Lys Leu Leu Arg Val Asn Leu Cys Glu		
625	630	635
TGT ACT CAT CCA ACT CAG TGT CGC ACT TCA AGG AGT ACA GGA GTA 2124		
Cys Thr His Pro Thr Gln Cys Arg Ala Thr Ser Arg Ser Thr Gly Val		
645	650	655
ATA CTT GGA AAA TGG GCA ATC CTT GCA ATA TTA CTG GGT ATA GCA CTG 2172		
Ile Leu Gly Lys Trp Ala Ile Leu Ala Ile Leu Leu Gly Ile Ala Leu		
660	665	670
CTC TTT TCT GTA TTG CTA ACT TTA GTA TGT GGA GTT TTT GGT GCA ACT 2220		
Leu Phe Ser Val Leu Leu Thr Leu Val Cys Gly Val Phe Gly Ala Thr		
675	680	685
AAA CGG AAA CGT TTT CCT GAA GAT TTA GCA CAG CAA AAC TTA ATT ATA 2268		
Lys Gly Lys Arg Phe Pro Glu Asp Leu Ala Gln Gln Asn Leu Ile Ile		
690	695	700
TCA AAC ACA GAA GCA CCT GGA GAC GAT AGA GTG TGC TCT GCC AAT GGA 2316		
Ser Asn Thr Glu Ala Pro Gly Asp Asp Arg Val Cys Ser Ala Asn Gly		
705	710	715
TTT ATG ACC CAA ACT ACC AAC AAC TCT AGC CAA GGT TTT TGT GGT ACT 2364		
Phe Met Thr Gln Thr Thr Asn Asn Ser Ser Gln Gly Phe Cys Gly Thr		
725	730	735
ATG GGA TCA GGA ATG AAA AAT GGA GGG CAG GAA ACC ATT GAA ATG ATG 2412		
Met Gly Ser Gly Met Lys Asn Gly Gln Glu Thr Ile Glu Met Met		
740	745	750
AAA CGA GGA AAC CAG ACC TTG GAA TCC TGC CGG GGG GCT GGG CAT CAT 2460		

Lys Gly Gly Asn Gln Thr Leu Glu Ser Cys Arg Gly Ala Gly His His
755 760 765
CAT ACC CTG GAC TCC TGC AGG GGA GGA CAC ACG GAG GTG GAC AAC TGC 2508
His Thr Leu Asp Ser Cys Arg Gly Gly His Thr Glu Val Asp Asn Cys
770 775 780
AGA TAC ACT TAC TCG GAG TGG CAC ACT TTT ACT CAA CCC CGT CTC GGT 2556
Arg Tyr Thr Tyr Ser Glu Trp His Ser Phe Thr Gln Pro Arg Leu Gly
785 790 795 800
GAA AAA TTG CAT CGA TGT AAT CAG AAT GAA GAC CGC ATG CCA TCC CAA 2604
Glu Lys Leu His Arg Cys Asn Gln Asn Glu Asp Arg Met Pro Ser Gln
805 810 815
GAT TAT GTC CTC ACT TAT AAC TAT GAG GGA AGA GGA TCT CCA GCT GGT 2652
Asp Tyr Val Leu Thr Tyr Asn Tyr Glu Gly Arg Gly Ser Pro Ala Gly
820 825 830
TCT GTG GGC TGC TGC AGT GAA AAG CAG GAA GAA GAT GGC CTT GAC TTT 2700
Ser Val Gly Cys Cys Ser Glu Lys Gln Glu Glu Asp Gly Leu Asp Phe
835 840 845
TTA AAT AAT TTG GAA CCC AAA TTT ATT ACA TTA GCA GAA GCA TGC ACA 2748
Leu Asn Asn Leu Glu Pro Lys Phe Ile Thr Leu Ala Glu Ala Cys Thr
850 855 860
AAG AGA TAATGTCACA GTGCTACAAT TAGGTCTTG TCAGACATTG TGGAGGTTTC 2804
Lys Arg
865
CAAAAAATAAT ATTGTAAAGT TCAATTCAA CATGTATGTA TATGATGATT TTTTCTCAA 2864
TTTGAAATTA TGCTACTCAC CAATTATAT TTTAAAGCA AGTTCTTGCT TATCTTTCC 2924
AAAAAGTGAA AAATGTTAAA ACAGACAACT GGTAAATCTC AAACTCCAGC ACTGGAATTA 2984

AGGTCTCTAA AGCATCTGCT CTTTTTTTTT TTTACAGATA TTTTAGTAAT AAATATGCTG 3044

GATAAATATT AGTCCAACAA TAGCTAAGTT ATGCTAATAT CACATTATTA TGTATTCACT 3104

TTAAGTGATA GTTTAAAAAA TAAACAAGAA ATATTGACTA TCACTATGTC AAGAAAGTTT 3164

TGGAAAAGAA ACAATGAAGA CTGAATTAAA TTAAAAATGT TGCAGCTCAT AAAGAATTGG 3224

ACTCACCCCT ACTGCACTAC CAAATTCACT TGACTTTGGA GGCAAAATGT GTTGAAGTGC 3284

CCTATGAAGT AGCAATTTTC TATAGGAATA TAGTTGGAAA TAAATGTGTG TGTGTATATT 3344

ATTATTAATC AATGCAATAT TTAAATGAAA TGAGAACAAA GAGGAAATG GTAAAACCTT 3404

GAAATGAGGC TGGGTATAG TTTGTCTAC AATAGAAAAA AGAGAGAGCT TCCTAGGCCT 3464

GGGCTCTAA ATGCTGCATT ATAAC TGAGT CTATGAGGAA ATAGTTCTG TCCAATTGCT 3524

GTAATTGTT TAAAATTGTA AATAAT 3551

配列番号：4

配列の長さ：167

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

起源：ホモ サピエンス (Homo Sapiens)

セルライン：HT-1376

配列：

GAG CCA GAC AAA ATA ATT GCC AGA GTT AAT TTG GAA GAG TGC TTC AGG 48
 Glu Ala Asp Lys Ile Ile Gly Arg Val Asn Leu Glu Glu Cys Phe Arg
 1 5 10 15
 TCT GCA GAC CTC ATC CGG TCA AGT GAT CCT GAT TTC AGA GTT CTA AAT 96
 Ser Ala Asp Leu Ile Arg Ser Ser Asp Pro Asp Phe Arg Val Leu Asn
 20 25 30
 GAT GGG TCA GTG TAC ACA GCC AGG GCT GTT GCG CTG TCT GAT AAG AAA 144
 Asp Gly Ser Val Tyr Thr Ala Arg Ala Val Ala Leu Ser Asp Lys Lys
 35 40 45
 AGA TCA TTT ACC ATA TGG CTT TC 167
 Arg Ser Phe Thr Ile Trp Leu
 50 55

配列番号：5

配列の長さ：21

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：N末端フラグメント

起源：ホモ・サピエンス (Homo Sapiens)

セルライン：HT-1376

配列：

Ala Cys Lys Lys Val Ile Leu Asn Val Pro Ser Lys Leu Glu Ala Asp
 1 5 10 15
 Lys Ile Ile Gly Arg 21
 20

配列番号：6

配列の長さ：7

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

起源：ホモ サピエンス (Homo Sapiens)

セルライン：HT-1376

配列：

Ala Val Ala Leu Ser Asp Lys

1 5

7

配列番号：7

配列の長さ：10

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

起源：ホモ サピエンス (Homo Sapiens)

セルライン：HT-1376

配列：

Glu Val Xaa Val Leu Leu Glu Xaa Gln Lys

1 5 10

10

配列番号：8

配列の長さ：8

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

起源：ホモ サピエンス (Homo Sapiens)

セルライン：HT-1376

配列：

Ala Ser Phe Thr Ile Trp Leu Ser

1 5

8

配列番号：9

配列の長さ：20

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：N末端フラグメント

起源：ホモ サピエンス (Homo Sapiens)

セルライン：HT-1376

配列：

Cys Lys Lys Val Ile Leu Asn Val Pro Ser Lys Leu Glu Ala Asp Lys

1 5 10 15

Ile Ile Gly Arg 20

20

配列番号：10

配列の長さ：19

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：N末端フラグメント

起源：ホモ サピエンス (Homo Sapiens)

セルライン：HT-1376

配列：

Cys Lys Lys Val Ile Leu Asn Val Pro Ser Lys Leu Glu Ala Asp Lys

1	5	10	15
Ile	Ile	Gly	
			19

配列番号：11

配列の長さ：13

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

起源：ホモ サピエンス (Homo Sapiens)

セルライン：HT-1376

配列：

Cys	Lys	Lys	Val	Ile	Leu	Asn	Val	Pro	Ser	Lys	Leu	Glu	13
1			5			10							

配列番号：12

配列の長さ：11

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

起源：ホモ サピエンス (Homo Sapiens)

セルライン：HT-1376

配列：

Ala	Asp	Lys	Ile	Ile	Gly	Arg	Val	Asn	Leu	Glu	11
1			5			10					

配列番号：13

配列の長さ：52

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

起源：ホモ サピエンス (Homo Sapiens)

セルライン：HT-1376

配列：

Cys Phe Arg Ser Ala Asp Leu Ile Arg Ser Ser Asp Pro Asp Phe Arg

1 5 10 15

Val Leu Asn Asp Gly Ser Val Tyr Thr Ala Arg Ala Val Ala Leu Ser

20 25 30

Asp Lys Lys Arg Ser Phe Thr Ile Trp Leu Ser Asp Lys Arg Lys Gln

35 40 45

Thr Gln Lys Glu 52

50

配列番号：14

配列の長さ：6

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

起源：ホモ サピエンス (Homo Sapiens)

セルライン：HT-1376

配列：

Val Thr Val Leu Leu Glu

6

1 5

配列番号：15

配列の長さ：13

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

起源：ホモ サピエンス (*Homo Sapiens*)

セルライン：HT-1376

配列：

His Gln Lys Lys Val Ser Lys Thr Arg His Thr Arg Glu	13
1 5	10

配列番号：16

配列の長さ：19

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

起源：ホモ サピエンス (*Homo Sapiens*)

セルライン：HT-1376

配列：

Thr Val Leu Arg Arg Ala Lys Arg Arg Trp Ala Pro Ile Pro Cys Ser	15
1 5	10
Met Gln Glu	19

配列番号：17

配列の長さ：11

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：C末端フラグメント

起源：ホモ サピエンス (*Homo Sapiens*)

セルライン：HT-1376

配列：

His Gln Lys Lys Val Ser Lys Thr Arg His Thr	11
1 5	10

配列番号：18

配列の長さ：11

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

起源：ホモ サピエンス (Homo Sapiens)

セルライン：HT-1376

配列：

Ala Asp Lys Ile Ile Gly Arg Val Asn Leu Glu	11	
1	5	10

配列番号：19

配列の長さ：6

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

起源：ホモ サピエンス (Homo Sapiens)

セルライン：HT-1376

配列：

Val Thr Val Leu Leu Glu	6
1	5

配列番号：20

配列の長さ：13

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：N末端フラグメント

起源：ホモ サピエンス (*Homo Sapiens*)

セルライン：HT-1376

配列：

Cys Lys Lys Val Ile Leu Asn Val Pro Ser Lys Leu Glu

13

1 5 10

配列番号：21

配列の長さ：13

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

起源：ホモ サピエンス (*Homo Sapiens*)

セルライン：HT-1376

配列：

Glu Cys Phe Arg Ser Ala Asp Leu Ile Arg Ser Ser Asp

13

1 5 10

配列番号：22

配列の長さ：11

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：C末端フラグメント

起源：ホモ サピエンス (*Homo Sapiens*)

セルライン：HT-1376

配列：

His Gln Lys Lys Val Ser Lys Thr Arg His Thr

11

1 5 10

配列番号：23

配列の長さ：321

配列の型：cDNA to mRNA

トポロジー：直鎖状

配列の種類：核酸

起源：ホモ サピエンス (Homo Sapiens)

セルライン：HT-1376

配列：

ATG GCC TGC AAA AAG GTG ATA CTT AAT GTA CCT TCT AAA CTA GAG GCA 48

Met Ala Cys Lys Lys Val Ile Leu Asn Val Pro Ser Lys Leu Glu Ala

1 5 10 15

GAC AAA ATA ATT GGC AGA GTT AAT TTG GAA GAG TGC TTC AGG TCT GCA 96

Asp Lys Ile Ile Gly Arg Val Asn Leu Glu Glu Cys Phe Arg Ser Ala

20 25 30

GAC CTC ATC CGG TCA AGT GAT CCT GAT TTC AGA GTT CTA AAT GAT GGG 144

Asp Leu Ile Arg Ser Ser Asp Pro Asp Phe Arg Val Leu Asn Asp Gly

35 40 45

TCA GTG TAC ACA GCC AGG GCT GTT GCG CTG TCT GAT AAG AAA AGA TCA 192

Ser Val Tyr Thr Ala Arg Ala Val Ala Leu Ser Asp Lys Lys Arg Ser

50 55 60

TTT ACC ATA TGG CTT TCT GAC AAA AGG AAA CAG ACA CAG AAA GAG GTT 240

Phe Thr Ile Trp Leu Ser Asp Lys Arg Lys Gln Thr Gln Lys Glu Val

65 70 75 80

ACT GTG CTG CTA GAA CAT CAG AAG AAG GTA TCG AAG ACA AGA CAC ACT 288

Thr Val Leu Leu Glu His Gln Lys Lys Val Ser Lys Thr Arg His Thr

85 90 95

AGA GAA ACT GTT CTC AGG CGT GCC AAG AGG TAA

321

Arg Glu Thr Val Leu Arg Arg Ala Lys Arg

100

105

請求の範囲

1. 配列番号No. 1で表されるアミノ酸配列を実質的に含み、単球又はマクロファージ遊走活性を有する蛋白質。
2. 配列番号No. 2で表されるアミノ酸配列を実質的に含み、単球又はマクロファージ遊走活性を有する蛋白質。
3. 配列番号No. 1で表されるアミノ酸配列を実質的にコードするDNAを含む遺伝子。
4. 配列番号No. 2で表されるアミノ酸配列を実質的にコードするDNAを含む遺伝子。
5. 配列番号No. 3で表されるアミノ酸配列を実質的にコードするDNAを含む遺伝子。
6. 請求項3～5のいずれかの項記載の遺伝子を含む発現用組換えベクター。
7. 請求項6記載の発現用組換えベクターにより形質転換された形質転換体。
8. 請求項7記載の形質転換体を培養し、得られた培養物から請求項1記載の蛋白質を分離することを特徴とする請求項1記載の蛋白質の製造方法。
9. 請求項7記載の形質転換体を培養し、得られた培養物から請求項2記載の蛋白質を分離することを特徴とする請求項2記載の蛋白質の製造方法。
10. 請求項1記載の蛋白質を有効成分として含む免疫賦活剤。
11. 請求項2記載の蛋白質を有効成分として含む免疫賦活剤。
12. 請求項2記載の蛋白質を有効成分として含む創傷治療剤。
13. 有効成分である単球又はマクロファージ遊走活性を有する蛋白質及び医薬的に許容できる賦形剤を含む医薬組成物。
14. 創傷の治療に用いる請求項13記載の医薬組成物。
15. 免疫賦活に用いる請求項13記載の医薬組成物。
16. 有効量の単球又はマクロファージ遊走活性を有する蛋白質をヒトに投与することを特徴とする創傷の治療方法。
17. 有効量の単球又はマクロファージ遊走活性を有する蛋白質をヒトに投与することを特徴とする免疫賦活方法。

18. 創傷の治療のための、有効量の単球又はマクロファージ遊走活性を有する蛋白質のヒトへの使用。
19. 免疫賦活のための、有効量の単球又はマクロファージ遊走活性を有する蛋白質のヒトへの使用。

図 1

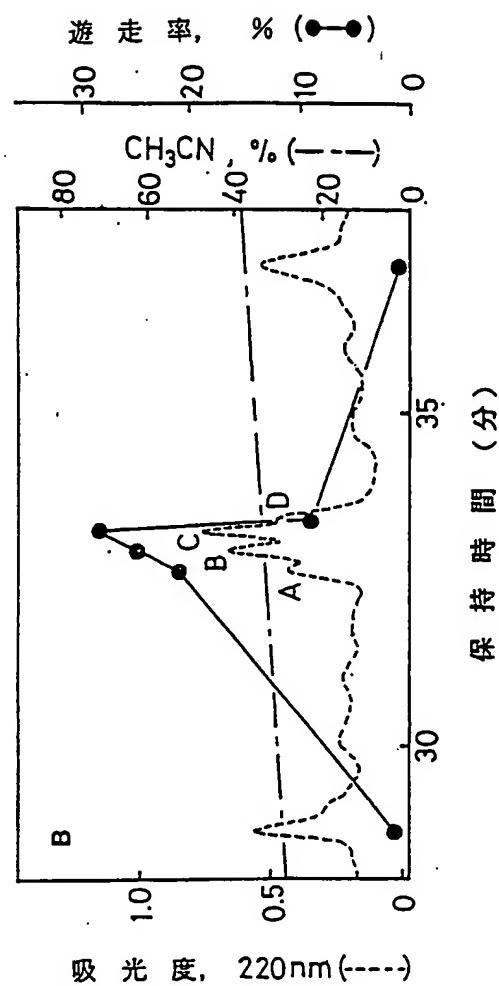


图 2

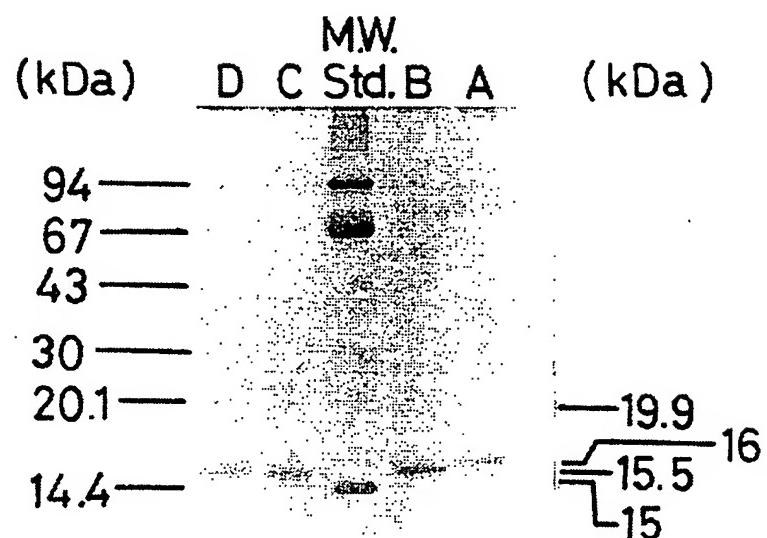


図 3

プライマー 1 : Leu-Glu-Ala-Asp-Lys-Ile-Ile-Gly

5' GAA GCT GAT AAA ATT ATT GG 3'

G C C G C . C

A A

プライマー 2 : Ala-Ser-Phe-Thr-Ile-Trp-Leu-Ser

3' AAA TGA TAA ACC GAC AG 5'

G C G G

T

図 4

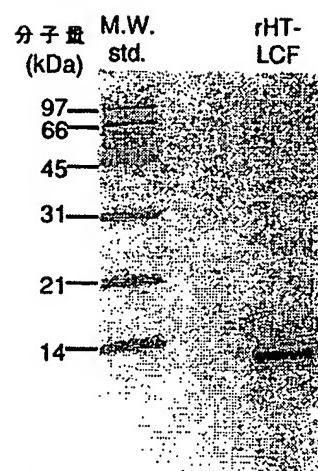


図 5

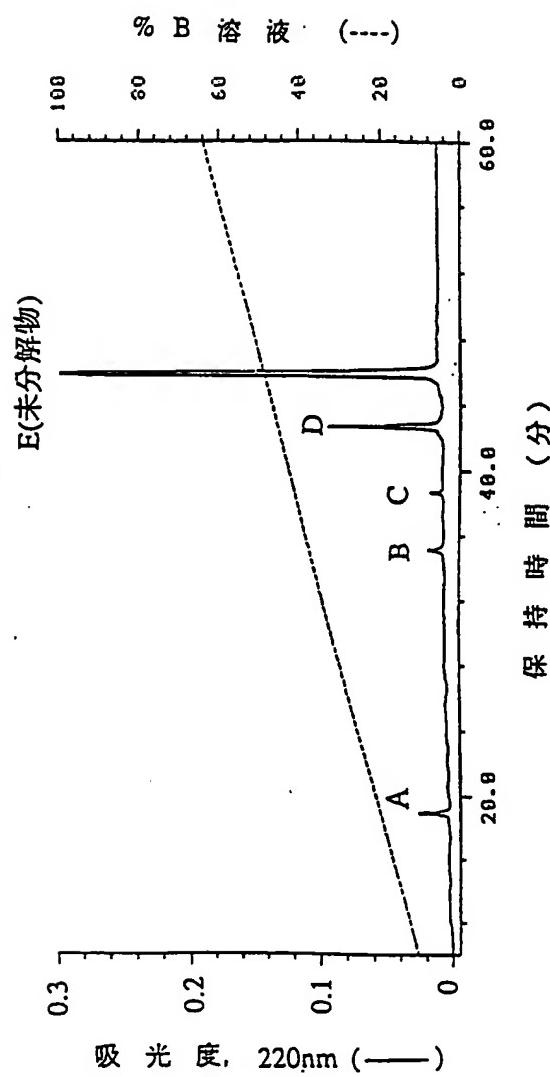


図 6

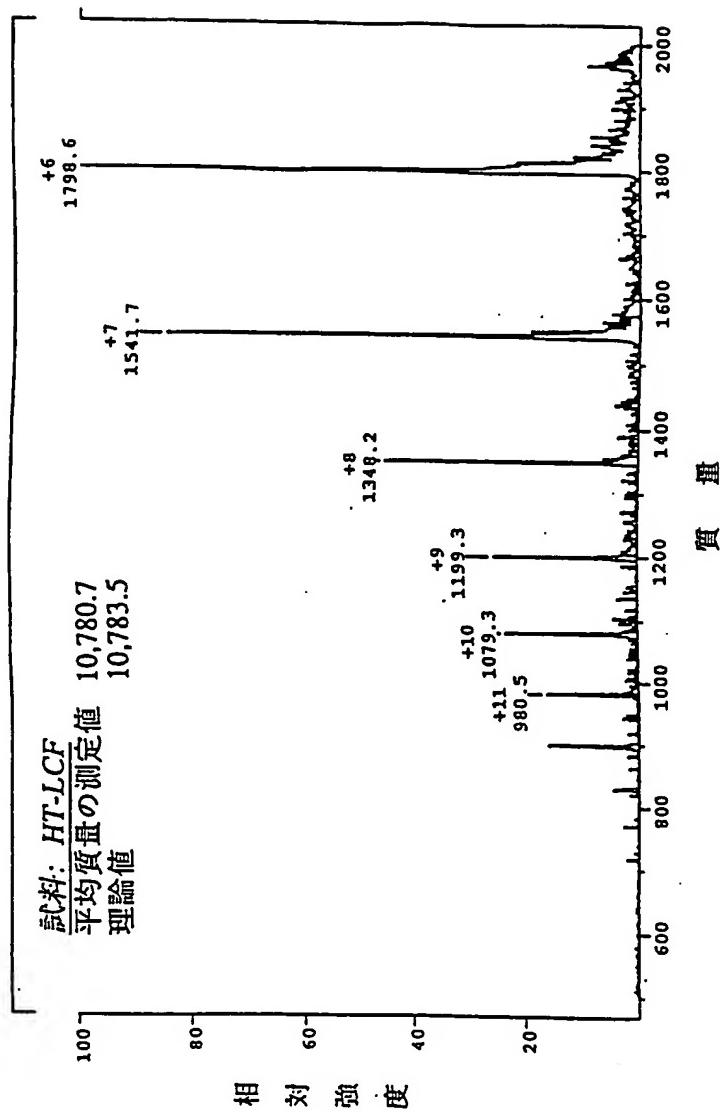


図 7

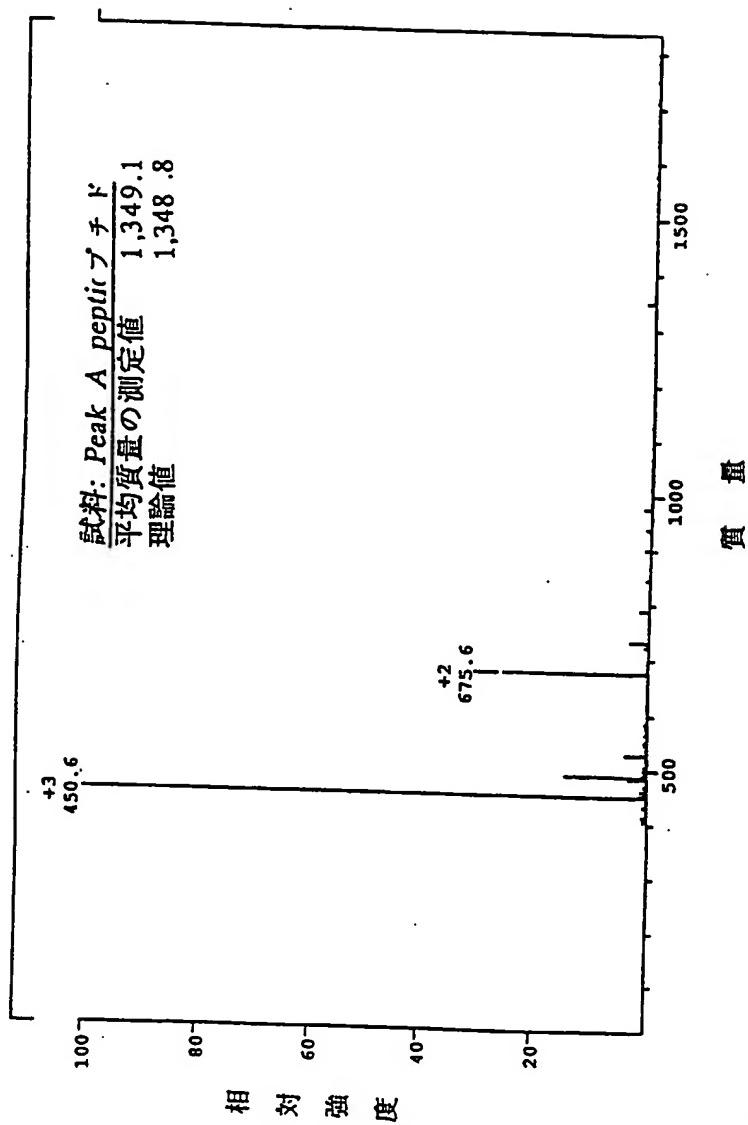


図 8

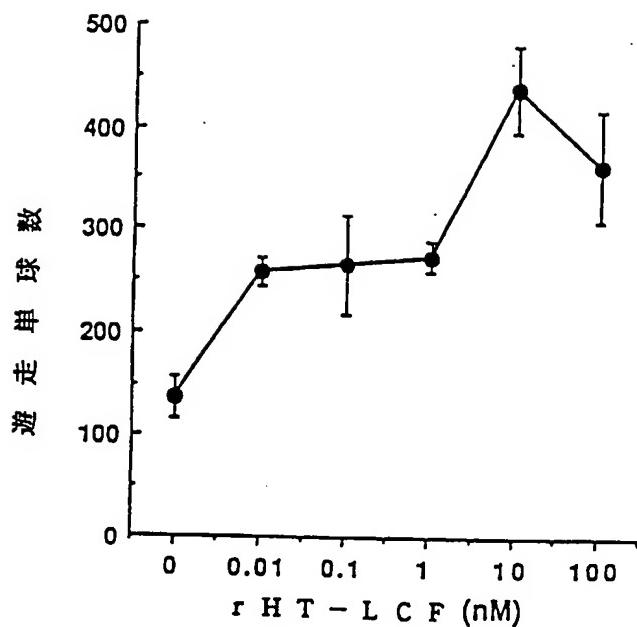


図 9

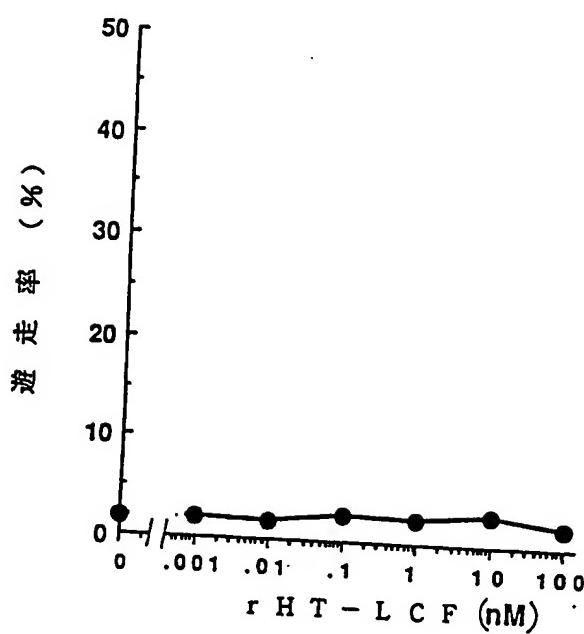


図 10

N末端側プライマー

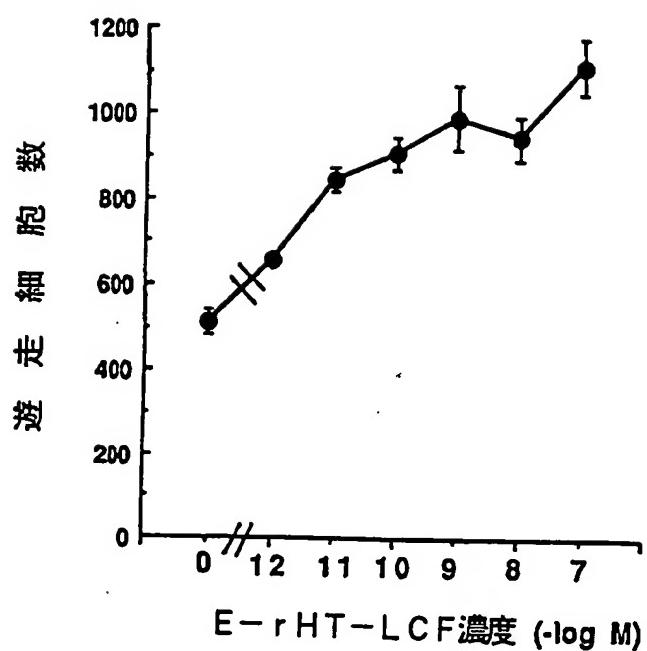
Met Ala Cys Lys Lys Val Ile Leu
5' -C GCC ATG GCC TCC AAA AAG GTG ATA CTT-3'

Nco I

C末端側プライマー（相補鎖側を設計）

終止 Arg Lys Ala Arg Arg Leu Val
5' -AA GGA TCC TTA CCT CTT GGC ACG CCT GAG AAC-3'
BamHI

図 11



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP94/00397

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
Int. C1 ⁵ C12N21/02, C12N15/19, C07K13/00, C12N5/10 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int. C1 ⁵ C12N21/02, C12N15/19, C07K13/00, C12N5/10		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAS ONLINE, WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A X	WO, A, 92/22664 (Dompe S.P.A.), December 23, 1992 (23. 12. 92) & AU, A, 9219013	1-12 13-15
P, X	JP, A, 5-271093 (Toray Industries, Inc.), October 19, 1993 (19. 10. 93), (Family: none)	13-14
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search May 9, 1994 (09. 05. 94)	Date of mailing of the international search report May 31, 1994 (31. 05. 94)	
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.	

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP 94/00397

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. CL^a C 12N 21/02, C 12N 15/19, C 07K 13/00,
C 12N 5/10

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. CL^a C 12N 21/02, C 12N 15/19, C 07K 13/00,
C 12N 5/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ONLINE,
WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS

C. 関連すると認められる文献

引用文獻の カテゴリー*	引用文獻名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A X	WO, A, 92/22664 (Dompe S.P.A.). 23. 12月. 1992 (23. 12. 92) & AU, A, 9219013	1-12 13-15
P, X	JP, A, 5-271093 (東レ株式会社). 19. 10月. 1993 (19. 10. 93) (ファミリーなし)	13-14

 C欄の続きにも文獻が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文獻のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文獻ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」先行文獻ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文獻又は他の文獻の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文獻(理由を付す)
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文獻
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文獻

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文獻であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のため引用するもの
- 「X」特に関連のある文獻であって、当該文獻のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文獻であって、当該文獻と他の1以上の文獻との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文獻

国際調査を完了した日

09. 05. 94

国際調査報告の発送日

31.05.94

名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号100
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

鶴 勤 健

4 B	9 2 8 1
-----	---------

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT OR DRAWING
- BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- GRAY SCALE DOCUMENTS
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.
As rescanning documents *will not* correct images problems checked, please do not report the problems to the IFW Image Problem Mailbox